

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

Studien zur Biosynthese glomerulärer
Basalmembranen des Rindes

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereiches Chemie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Alfred Heilhecker
aus Wiesbaden

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549022_0033

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

STUDIEN ZUR BIOSYNTHESE GLOMERULÄRER
BASALMEMBRANEN DES RINDES

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereiches Chemie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Alfred Heilhecker
aus Wiesbaden



1. Referent: Prof. F. v. Bruchhausen

2. Referent: Prof. G. Manecke

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 20.6.77

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	6
1.1. Vorkommen der Basalmembranen	6
1.2. Kenntnisse vom Aufbau der Basalmembranen	7
1.2.1. Chemische Zusammensetzung	7
1.2.2. Molekularer Aufbau	8
1.2.3. Morphologie der Basalmembranen	10
1.2.3.1. Lichtmikroskopischer Aufbau	10
1.2.3.2. Elektronenmikroskopischer Aufbau	11
1.3. Funktion der Basalmembranen	12
1.4. Kenntnisse zur Biosynthese und zum Umsatz der Basalmembranen	14
1.4.1. Ort der Synthese der glomerulären Basalmembranen	14
1.4.1.1. Aufbau des Glomerulus	14
1.4.1.2. Beteiligung glomerulärer Zellarten	17
1.4.2. Umsatz der Basalmembranen	18
2. Problemstellung	20
3. Material und Methoden	23
3.1. Gewinnung der Glomeruli	23
3.2. Inkubation	25
3.3. Gewinnung der Basalmembranen	25
3.4. Isolierung der Lamina densa	26
3.5. Kollagenextraktion	26
3.6. Reduktion und Alkylierung der Basalmembranen	27
3.7. Entfernung des Natriumdodecylsulfats	27
3.8. Gelchromatographische Auftrennung	27
3.9. Gelelektrophoretische Auftrennung	28
3.10. Radioaktivitätsbestimmung	29
3.11. Lipidanalysen	30
3.11.1. Extraktion der Lipide	30
3.11.2. Quantifizierung	30
3.11.3. Trennung der Lipide	31

	Seite
3.12. Zuckeranalysen	32
3.12.1. Hexosen	32
3.12.2. Fucose und Sialinsäure	34
3.12.3. Hexosamin	35
3.13. Bestimmung von DNA, RNA und Hydroxyprolin	35
4. Ergebnisse	36
4.1. Stoffwechselaktivität der Glomeruli	36
4.2. Lipide	38
4.2.1. Lipidgehalt der Basalmembranen	38
4.2.2. Radiomarkierung der Basalmembranlipide	38
4.2.3. Lipidgehalt der glomerulären Zellfraktion	40
4.2.4. Vergleich der spezifischen Aktivitäten der Lipide der Basalmembranen und der glomerulären Zellfraktion	40
4.2.5. Stoßmarkierung	43
4.3. Kohlenhydrate	43
4.3.1. Zuckergehalt der Basalmembranen	43
4.3.2. Radiomarkierung der Zucker	47
4.4. Löslichkeit und Fraktionierung	47
4.4.1. Gelelektrophorese	47
4.4.2. Löslichkeit	52
4.4.3. Kollagen	54
4.4.4. Chromatographische Trennung der Basalmembranen	55
4.4.5. Menge sowie Zucker- und Hydroxyprolingehalt der Fraktionen	59
4.4.6. Radiomarkierung der Fraktionen	65
5. Diskussion	66
5.1. Präparation und Stoffwechselaktivität der Glomeruli	66
5.2. Gewinnung der Basalmembranen	67
5.3. Reinheit der Basalmembranen	68
5.4. Verwendung der radioaktiven Vorstufen zur Biosynthese der Basalmembranen	70

	Seite
5.5. Zuckergehalt der Basalmembranen	72
5.6. Biosynthese der Basalmembranzucker	74
5.7. Lipide der Basalmembranen	79
5.8. Biosynthese der Lipide	80
5.9. Aufbau der Basalmembranen	83
6. Zusammenfassung	94
7. Literatur	98

1. Einleitung

1.1. Vorkommen der Basalmembranen.

Als Basalmembranen werden im Organismus weitverbreitete extrazelluläre Strukturen bezeichnet, die in Verbindung mit nahezu allen Zellarten auftreten (Lillie 1952, Pease 1960). Sie kommen als Strukturelemente nicht nur bei höheren Organismen vor, sondern auch bei niederen (Ashhurst 1968). Als ausgeprägte Grenzsichten finden sich Basalmembranen zwischen Bindegewebe und Epithel. Sie sind ein Teil des Sarko- und Neurolemm und in der Regel auch ein wichtiger Bestandteil der Blutkapillaren.

Beispiele für besonders gut ausgebildete Basalmembranen im höheren Organismus sind die Linsenkapsel des Auges, die Descemetsche Membran der Cornea, die Bruchsche Membran der Chorioidea, die glomeruläre und tubuläre Basalmembran in der Niere, sowie die alveoläre der Lunge.

In ihrer Verbindung mit Eingeweide-, Drüsen- und Alveolarepithel sind die Basalmembranen mit Zellen assoziiert, die sich entwicklungsgeschichtlich vom Ektoderm herleiten (Locy und Larcell 1916, Hunt 1937, McKeegan 1951, Pirie 1951, Kefalides 1969 a, Kefalides und Denduchis 1969). In der Descemetschen Membran und in den Kapillaren sind sie dagegen mit Zellen des Mesenchyms verbunden (Hughes 1943, Jakus 1964, Hay 1968, Hay und Revel 1969, Kefalides und Denduchis 1969).

Obwohl Basalmembranen im Organismus weitverbreitet sind, ist ihr Anteil in den Geweben meist äußerst gering. Zusätzlich sind sie noch fest verbunden mit den anderen fibrillären Elementen unlöslicher extrazellulärer Proteine, wie Kollagen und Elastin.

Die Gewinnung von Basalmembranen in ausreichender Menge und Reinheit für chemische Untersuchungen ist daher mit einigen technischen Schwierigkeiten verbunden. Sie können bisher nur aus solchen Geweben isoliert werden, die einen hohen Anteil besitzen und eine anatomisch gut zugängliche Lage einnehmen. Beschrieben sind Methoden zur Gewinnung der Linsenkapsel (Pirie 1951, Dische 1964,

Fukushi und Spiro 1969), der Descemetschen Membran (Dohlman und Balazs 1955, Kefalides und Denducis 1969) und der Basalmembranen der renalen Glomeruli (Krakower und Greenspon 1951, Lazarow und Speidel 1964, v. Bruchhausen und Merker 1965 a, Lidsky et al 1967, Spiro 1967 a) und Tubuli (Goodman et al 1955, Mahieu und Winand 1969, Welling und Grantham 1972, Ferwerda et al 1974).

1.2. Kenntnisse vom Aufbau der Basalmembranen.

1.2.1. Chemische Zusammensetzung.

Chemisch bestehen die Basalmembranen zum überwiegenden Teil aus einem proteinhaltigen Material (Lazarow und Speidel 1964, Lange und Markowitz 1965, Kefalides und Winzler 1966, Misra und Kalant 1966, Lidsky et al 1967, Spiro 1967 a, 1970 b, Fukushi und Spiro 1969, Kefalides und Denduchis 1969, Mahieu und Winand 1969, 1970, Denduchis et al 1970, Kefalides 1970, 1973, Blau und Michael 1971, Marquardt et al 1973 b, Ferwerda et al 1974). Auffallend hoch ist der Gehalt an Hydroxyprolin, einer Aminosäure, die für Kollagen charakteristisch ist. Im Vergleich zu fibrillärem Kollagen (Gross 1963, Bailey 1968, Spiro 1972) enthalten sie jedoch weniger Hydroxyprolin und Glycin, aber mehr Hydroxylysin sowie relativ viel Cystein.

Allen Basalmembranen gemeinsam ist ein hoher Gehalt an Kohlenhydraten. Die Zucker, von denen sich immer Glukose, Galaktose, Mannose, Fucose, Glukosamin und Sialinsäure nachweisen lassen, sind kovalent an die Membranproteine gebunden und somit Bestandteil von Glykoproteinen (zur Definition von Glykoproteinen: Gottschalk 1966). Uronsäuren und Sulfat werden nur in den Präparationen der Linsenkapsel gefunden, die demnach Glukosaminoglykane enthalten kann (Dische et al 1967, Fukushi und Spiro 1969).

Die Zusammensetzung sowohl der Aminosäuren als auch der Kohlenhydrate verschiedener Basalmembranen ist qualitativ sehr ähnlich, differiert quantitativ jedoch beträchtlich. Sie ist eindeutig abhängig von der anatomischen Herkunft der Basalmembran, scheint

aber unabhängig von der Spezies zu sein (Kefalides 1970, 1971 a, 1973, Spiro 1970 b, c, 1972). Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß altersbedingte Veränderungen in der Zusammensetzung auftreten, da normalerweise mit zunehmendem Lebensalter eine Querschnittsverdickung der Basalmembranen eintritt (Bloom et al 1959, Ashworth et al 1960, Guttman und Kohn 1960, Chiquoine 1961, Wolff 1962, Rosenquist und Bernick 1971, Regnault und Kern 1974).

Umstritten ist, ob Basalmembranen Lipide enthalten. Obwohl histochemische und polarisationsoptische Untersuchungen auf Lipidanteile hinweisen (Niessing und Rollhäuser 1954, Missmahl 1957, Scheuner und Hutschenreiter 1971, Glöckner et al 1974), werden sie von manchen Autoren als Verunreinigungen angesehen (Kefalides und Winzler 1966, Hempel und Geyer 1967, Spiro 1967 a, Westberg und Michael 1970, Nicholes et al 1973). Andere Arbeitsgruppen betrachten dagegen die in den Präparationen nachweisbaren Lipide als integralen Bestandteil der Basalmembranen (Dische et al 1965, v. Bruchhausen und Merker 1965 b, 1966, Misra und Berman 1966, Lidsky et al 1967, Gang und Kalant 1970, Wahl und Deppermann 1970, Fung und Kalant 1972, Sternberg und Kalant 1973, Sato et al 1975, Kibel et al 1974, 1976).

1.2.2. Molekularer Aufbau.

Die Möglichkeit, Basalmembranen durch Gelelektrophorese aufzutrennen, zeigt, daß sie kein einheitliches Protein sind, sondern ein Komplex aus mehreren Polypeptiden (Kefalides 1970, Hudson und Spiro 1972, Myers und Bartlett 1972, Marquardt et al 1973 a). Versuche, die einzelnen Proteine zu isolieren und zu charakterisieren, führten jedoch zu keinen übereinstimmenden Ergebnissen, so daß die Vorstellungen über ihre Art und Anordnung in den Basalmembranen kontrovers sind.

Aufgrund seiner Untersuchungen betrachtet Spiro (1970 b, c, 1971, 1972, 1973 b, Hudson und Spiro 1972, Sato und Spiro 1976) Basalmembranen als ein Netzwerk aus verschieden-großen aber in sich einheitlichen Peptidketten, in deren Molekül sich kollagen-

artige Bereiche mit nichtkollagenartigen abwechseln.

Das alternativ Modell beschreibt Basalmembranen als aus unterschiedlichen wohldefinierten Proteineinheiten aufgebaut, und zwar aus einem oder mehreren Glykoproteinen und aus Kollagen (Kefalides 1969, 1970, 1971 a, 1973, 1974).

Erlauben auch die bisher durchgeführten Untersuchungen keine eindeutige Entscheidung für eines dieser Modelle, so sprechen sie doch mehr für die Vorstellungen von Kefalides. Basalmembranen werden in fallender Aktivität von den proteolytischen Enzymen Kollagenase, Pronase, Pepsin und Trypsin angegriffen (Sharp et al 1967, Spiro 1967). Nach ihrem enzymatischen Abbau können durch chromatographische Trennung neben hydroxyprolinhaltigen auch hydroxyprolinfreie Glykopeptidfraktionen gewonnen werden (Lange und Markowitz 1965, Thoenes und Hammer 1967, Huang und Kalant 1968, Shibata et al 1969, 1970, Denduchis und Kefalides 1970, Kefalides 1972 b, Bardos et al 1973, 1974, 1976, Marquardt et al 1973 b, Skoza und Mohos 1974).

Die Zucker der Basalmembranen hängen in Form von zwei definierten Saccharideinheiten am Proteingerüst. Zum einen bilden sie ein Heteropolysaccharid aus Galaktose, Mannose, Fucose, Hexosamin und Sialinsäure, das über eine Amidbindung mit Asparagin verknüpft ist, zum anderen ein Disaccharid aus Glukose und Galaktose, das O-glykosidisch an Hydroxylysin gebunden ist (Spiro 1967 b, c, Mahieu und Winand 1970). Die Disaccharideinheit und ihre Verknüpfungsart mit dem Protein ist typisch für Kollagene (Butler und Cunningham 1965, 1966, Gallop et al 1972, Grant und Prockop 1972, Spiro 1972). Das Oligosaccharid dagegen ähnelt sehr den Zuckerkomponenten von typischen Glykoproteinen (Gottschalk 1963, Spiro 1969, Marshall und Neuberger 1970, Marshall 1974).

Die Röntgen- beziehungsweise Elektronenbeugungsspektren der Linsenkapsel (Pirie 1951), der Descemetischen Membran (Jakus 1956) und der glomerulären Basalmembran (Kalant et al 1966, Kefalides und Winzler 1966, Lidsky et al 1967) zeigen große Ähnlichkeit mit Aufnahmen von Haut- und Sehnenkollagen.

Durch limitierten Abbau der Basalmembranen mit Pronase oder Pepsin, ein Verfahren, mit dem polymeres Kollagen gelöst werden kann (Rubin et al 1965, Drake et al 1966), läßt sich eine Proteinfraction gewinnen, die in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften Kollagen entspricht (Kefalides 1968, 1969, 1971, 1972 a, Kefalides und Denduchis 1969). Dieses Kollagen ist aus drei gleichen α -1 Ketten aufgebaut und enthält einen relativ hohen Anteil an Zuckern (10 bis 12%), die als Disaccharid aus Glukose und Galaktose vorliegen (Kefalides 1971 b).

Die Kollagenkomponente kann auch nach der Methode von Fitch et al (1955) durch Extraktion mit heißer 5%iger Trichloressigsäure isoliert werden (Dische et al 1965, Kefalides 1966, Heilhecker und v. Bruchhausen 1973, 1976). Auch die Befunde morphologischer Untersuchungen der Basalmembranen sprechen für einen Aufbau aus Glykoproteinen und Kollagen.

1.2.3. Morphologie der Basalmembranen.

1.2.3.1. Lichtmikroskopischer Aufbau.

Betrachtet man die Basalmembranen nach histologischer Färbung unter dem Mikroskop, so zeigt sich, daß sie immer aus zwei Komponenten - einer homogenen und einer fibrillären - zusammengesetzt sind (Lillie 1952, Braun-Falco 1955, Graumann 1964). Der fibrilläre Bestandteil liegt als dreidimensionales Netzwerk aus argyrophilen Fasern vor, das in den homogenen Teil eingebettet ist. Dieser läßt sich besonders gut durch die Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) darstellen, die unter anderem Glykoproteine nachweist (Felgenhauer 1968, Zacharius et al 1969).

Bei Einwirkung von Trypsin auf die Basalmembranen wird nur das PAS-positive Material angegriffen. Kollagenase dagegen baut nur das argyrophile Faserwerk ab, verändert aber nicht die homogene Matrix (Rosenquist und Bernick 1971). Offensichtlich ist der homogene Anteil Glykoproteinen und das Faserwerk Kollagen zuzuordnen. Die für Kollagenfasern typische Querstreifung läßt sich allerdings nicht nachweisen. Es ist daher wahrscheinlich, daß die Kollagenkomponente der Basalmembranen in nicht fibrillärer Form vorliegt, sondern als Tropo- oder Prokollagen, die diese Querstreifung nicht zeigen (Bornstein et al 1975, Tanzer et al 1975).

Anfärbbarkeit, z.B. mit PAS und Argyrophilie der Basalmembranen sind nicht gleich stark ausgeprägt, sondern von Organ zu Organ und selbst innerhalb eines Organs verschieden (Lillie 1952, Wislocki und Padykula 1953, Klinger und Geyer 1965). In Übereinstimmung mit den analytischen Daten zeigt sich also auch hier, daß es Unterschiede in der Zusammensetzung der Basalmembranen geben kann.

Die Dicke der Basalmembranen beträgt bei ihrer Darstellung mit der PAS-Reaktion je nach anatomischer Lokalisation zwischen 15 und 10 000 nm.

1.2.3.2. Elektronenmikroskopischer Aufbau.

Dagegen erscheint in elektronenmikroskopischen Aufnahmen die Basalmembran als ein mehrere Nanometer (10 bis 100 nm) dickes Band, das annähernd parallel zu den Zellmembranen der ihm aufsitzenden Zellen verläuft. Nur im Glomerulus erreicht es eine Dicke von 200 bis 400 nm. Nach Osmiumsäurefixierung erkennt man, daß die Basalmembranen aus drei Schichten aufgebaut sind (Bargmann et al 1955, Rhodin 1955, Bargmann und Knoop 1956, Karrer 1956, 1958, Bargmann 1958, Thiel 1958, Wolff 1962, 1963). Sie bestehen aus einer elektronendichten Mittelschicht, der Lamina densa (Hall 1953, Yamada 1955), der beiderseits elektronendünnere Schichten, die Lamina rara externa und interna (Yamada 1955), angelagert sind. Die Laminae rarae wurden zeitweise als Artefakte, hervorgerufen durch die Präparation, betrachtet (Bergstrand und Bucht 1958). Es hat sich aber aufgrund ihrer Darstellbarkeit mit verschiedenen Fixierungsmethoden die Ansicht durchgesetzt, daß sie ein integraler Bestandteil der Basalmembranen sind (Rhodin 1955, Huhn et al 1962, Graham und Karnovsky 1966, Jørgensen 1966, 1967, Gang 1970, Latta 1970, Walker 1973).

Bei hoher Auflösung und zusätzlicher Kontrastierung mit Phosphorwolframsäure oder Uranylacetat erscheint die osmiophile Lamina densa als ein feines Fibrillenfilzwerk (Durchmesser der Fibrillen zwischen 3 und 4 nm), das in eine homogene Matrix eingebettet ist

(Karrer 1956, Thiel 1958, Sitte 1959, Kurtz und McManus 1960, Kurtz 1961, Farquhar et al 1961, v. Bruchhausen und Merker 1965 a, 1967, Friederici et al 1966, Gekle und Merker 1966, Latta et al 1967, Bruns und Palade 1968).

Die Laminae rarae der Basalmembranen erscheinen meist unstrukturiert und elektronendurchlässig. Es ist unklar, ob die hier gelegentlich beschriebenen feinsten Filamente der Lamina rara angehören, oder nur von der Lamina densa hineinprojiziert werden (Wolff 1962).

1.3. Funktion der Basalmembranen

Die morphologischen Untersuchungen der Basalmembranen erlauben aber auch Rückschlüsse auf ihre funktionelle Bedeutung. Basalmembranen halten im Organismus gewisse Strukturen aufrecht und dienen dabei als elastische Unterlage, in der die auf ihr liegenden Zellen verankert sind. Diese mechanische Aufgabe wird mit dem Begriff "Mikroskelett" umschrieben (Pease 1960). Darüberhinaus haben sie eine wichtige physiologische Aufgabe als Trenn- und Isolierschicht (Staubesand 1963). Ein Beispiel dafür, aber auch für ihre Stützfunktion, gibt die Basalmembran der Linsen kapsel. Sie bestimmt die Gestalt der Linse und beeinflusst außerdem den Stoffaustausch zwischen der Linsen kapsel und dem Humor aqueus einerseits sowie dem Humor vitreus andererseits.

In Kapillaren ohne kontinuierliche Endothelauskleidung, wie im Nierenglomerulus, scheint sie der eigentliche Filter für Stoffe mit höherem Molekulargewicht zu sein (Bennett et al 1959).

Durch die Kapillarschlingen des Glomerulus wird ein nahezu eiweiß-freies Ultrafiltrat des Plasmas - der Primärharn - in den Harnraum des Nierenkörperchen abgepreßt. Die Kapillarwand wirkt dabei wie ein Molekularsieb und hindert Makromoleküle in Abhängigkeit von ihrem effektiven Durchmesser und somit von ihrem Molekulargewicht am Durchtritt. Sie ist für Moleküle mit einem Gewicht über 70 000 praktisch unpassierbar.

Theoretisch läßt sich der Stofftransport durch die Kapillarwand als passive Molekularsiebung durch eine poröse Membran beschreiben, wobei Größe und Form der Poren bestimmen, bis zu welcher Molekülgröße Substanzen filtriert werden können. Die treibende Kraft für die Filtration ist der effektive hydrostatische Druck des Plasmas innerhalb der Kapillare, der durch die algebraische Summe aus hydrostatischem und osmotischem Druckgefälle über die Kapillarwand gegeben ist (Renkin und Gilmore 1973).

Aus Clearanceuntersuchungen mit Proteinen berechneten Pappenheimer und Mitarbeiter (Pappenheimer 1955, Renkin und Pappenheimer 1957), unter Annahme zylindrischer Poren gleicher Größe für den Filter des Glomerulus einen Porenradius von 3,8 nm. Untersuchungen mit anderen Testmolekülen zeigen aber, daß die experimentellen Ergebnisse von Clearancemessungen sich nur dann befriedigend erklären lassen, wenn man unterschiedliche Porenradien annimmt, die einer Gaußschen Normalverteilung gehorchen und einen mittleren effektiven Radius von 3,6 nm besitzen (Scholtan 1959, Landis und Pappenheimer 1963). Nach neueren Berechnungen läßt sich die glomeruläre Filtration am besten erklären als Siebung durch die interfilamentären Zwischenräume eines Fasergewebes mit einer effektiven Maschenweite von 2,6 nm (Renkin und Gilmore 1973, Brenner et al 1976).

Diese Befunde stimmen mit dem feinstrukturellen Aufbau der Basalmembranen überein, wenn man die interfilamentären Zwischenräume in ihrem Fibrillennetz als Poren betrachtet (Sitte 1959, Thoenes 1961). Die Porengröße wird dann durch die Weite der Maschen bestimmt, die jedoch keinen einheitlichen Wert haben, sondern um einen Mittelwert streuen.

Elektronenoptisch konnten bisher Poren noch nicht in der Basalmembran nachgewiesen werden. Den indirekten Beweis, daß sie eine porenhaltige Membran ist, erbrachten Gekle und Mitarbeiter (1966). Sie bestimmten die Verteilungskoeffizienten verschieden großer Moleküle in isolierten, gequollenen Basalmembranen und finden, daß der Verteilungskoeffizient mit steigendem Molekulargewicht der Testsubstanz abnimmt. Durch Extrapolation auf den Verteilungskoeffizienten

effizienten Null ergibt sich ein Porenäquivalentradius, das heißt, der Radius der größten Masche, zu 4,2 bis 4,5 nm. Daraus berechnet sich ein mittlerer Porenradius von 2,9 nm. Mit isolierten Basalmembranen kann man außerdem, ähnlich wie mit vernetzten Dextranen, eine Molekularsiebung nach Art der Gelfiltration vornehmen (Huang et al 1967).

Einen direkten Hinweis auf die poröse Struktur der Basalmembranen geben die Untersuchungen zur Permeabilität von elektronenmikroskopisch nachweisbaren Substanzen. Injiziert man kolloides Lanthan in den Blutkreislauf, so sind die Kapillaren des Glomerulus für Aggregate bis zu einem Durchmesser von 2 nm durchlässig, während Partikel mit einem Durchmesser von 4 bis 7,5 nm innerhalb der Lamina densa angehäuft werden (Gang 1970 a). Größermolekulare Substanzen wie Ferritin oder Thorotrast (Farquhar und Palade 1959, 1962, Latta et al 1960, Farquhar et al 1961, Deodhar et al 1964, Farquhar 1964, Michael et al 1967, Pessina et al 1972) und Dextrane in der Größenordnung von Plasmaproteinen (MG 32 000 bis 125 000) werden in der Lamina rara interna angehäuft und gelangen weder in die Lamina densa noch Lamina rara externa (Caulfield und Farquhar 1974, 1975, Farquhar 1975). Jedoch lassen sich große Mengen an Testmolekülen im Harnraum nachweisen, wenn, wie bei unreifen Glomeruli, eine wohldefinierte Basalmembran fehlt (Vernier und Birch-Andersen 1963) oder die Experimente mit nephritischen Tieren durchgeführt werden (Farquhar und Palade 1961, Gang et al 1970, Caulfield und Farquhar 1975).

1.4. Kenntnisse zur Biosynthese und zum Umsatz der Basalmembranen.

1.4.1. Ort der Synthese der glomerulären Basalmembranen.

1.4.1.1. Aufbau der Glomerulus.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen, daß auch die glomerulären, wie alle Kapillarwände, aus mehreren Schichten aufgebaut sind. Sie weisen aber einige Besonderheiten auf. In Abbildung Nr. 1 ist die glomeruläre Kapillarwand schematisch dargestellt.

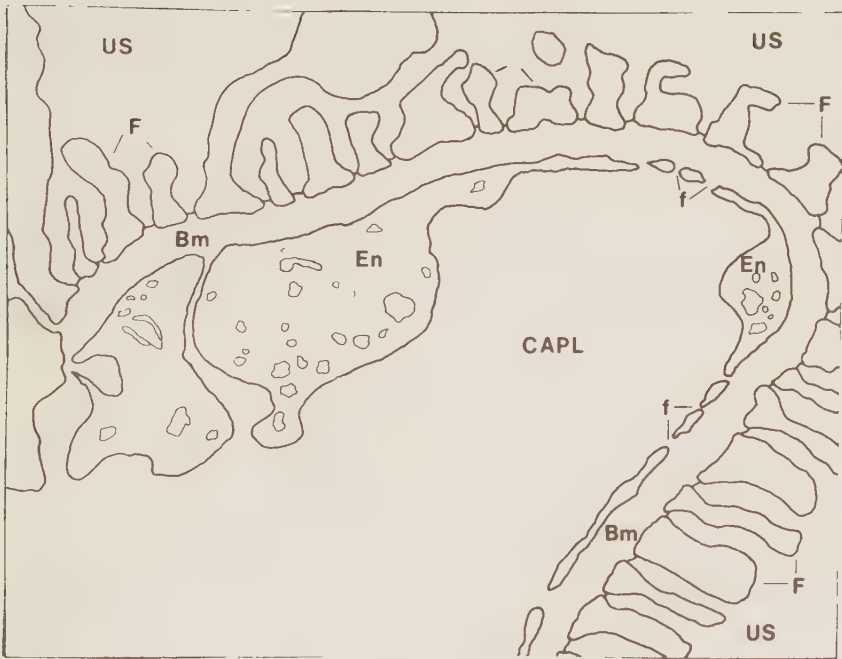


Abbildung 1: Schematische Darstellung der glomerulären Kapillarwand

US = Harnraum, CAPL= Kapillarlumen, Bm= Basalmembran
F= Fußfortsätze, EN= Endothel, f= Fenster

Das Endothel (Lamina Fenestrae, Hall 1953) kleidet das Kapillarlumen auf weite Strecken in Form von dünnen Zytoplasmaplatten mit einer Breite zwischen 40 und 200 nm aus und ist von zahlreichen Poren durchbrochen (Pease 1955). Der Durchmesser dieser Poren ist mit 50 bis 100 nm (Latta et al 1960, Rhodin 1962, Gekle und Merker 1966, Latta 1970) beträchtlich größer als bei anderen Kapillaren, die auch ein gefenestertes Endothel besitzen (Majno 1964). Ein Diaphragma, das die Porenöffnung überspannt, wie es bei der Maus beschrieben wird (Rhodin 1962), scheint bei den glomerulären Kapillaren anderer Spezies nicht vorhanden zu sein (Farquhar et al 1961, Latta 1970).

Die Basalmembran ist hier beträchtlich dicker als an anderen Orten; Ihre Dicke ist von der Größe der Spezies abhängig. Bei Ratte, Kaninchen und Maus hat sie eine Stärke zwischen 110 und 160 nm (Pease 1955 a, Rhodin 1955, Yamada 1955, Latta 1960, 1970, Farquhar et al 1961, Gekle und Merker 1966), beim Hund 200 bis 250 nm (Mueller et al 1955) und liegt bei Mensch, Affe und Rind zwischen 240 und 360 nm (Vernier 1964, Osawa et al 1966, Mueller et al 1955, Jørgensen und Bentzon 1968).

Die äußere in den Bowmanschen Raum ragende Schicht der Kapillarswand wird vom glomerulären Epithel gebildet. Diese Deckzellen zeigen eine Aufgliederung des Zytoplasmas in mehrere Ausläufer, die sich wiederum in kleinere Äste, sogenannte Fußfortsätze oder Pedikel verzweigen (Podocyten, Hall 1953). Die Fußfortsätze benachbarter Epithelzellen greifen zahnradartig ineinander, so daß die im Querschnittsbild auf der Basalmembran aufrecht nebeneinander stehenden Pedikel nicht einer Zelle, sondern jeweils umschichtig mindestens zwei verschiedenen Zellen zugehören (Arakawa 1970). Sie sind in die Lamina rara externa 40 bis 50 nm tief eingebettet. Die Oberfläche der Epithelzellen ist mit einer dicken (10 bis 15 nm) Glycocalyx bedeckt. Zwischen den Podocyten spannt sich ein Diaphragma (4 bis 6 nm dick) aus, die sogenannte "Schlitzmembran" (Yamada 1955). Die Schlitzmembran wird von Karnovsky und Mitarbeitern aufgrund von Pemeabilitätsstudien mit Katalasen und vor allem

mit Peroxidasen, also mit enzymatischen und damit histochemisch nachweisbaren Testsubstanzen, als eigentliche Filterschranke der glomerulären Kapillaren angesehen (Graham und Karnovsky 1966, Graham und Kellermeyer 1968, Venkatachalam et al 1970, Oliver und Essner 1972, Rodewald und Karnovsky 1974). Eine eindeutige Aussage über den wirksamen Filter läßt sich jedoch bei Verwendung dieser Enzyme nicht machen. Es ist nicht auszuschließen, daß sie in ihre niedermolekularen Untereinheiten zerfallen, die zum größten Teil noch enzymatischaktiv sind (Schultz et al 1967, Sund et al 1967), und daher die Basalmembran ungehindert durchdringen, aber an die stark negativ geladene Glycocalyx der Epithelzellen gebunden werden (Oliver und Essner 1972, Karnovsky und Ainsworth 1973, Karnovsky 1974, Schneeberger 1974). Eine weitere Schwierigkeit liegt darin, daß Artefakte durch die Fixierung und histochemische Darstellung auftreten können (Fahimi 1973, Novikoff et al 1972).

Außer Epithel- und Endothelzellen findet man im Glomerulus noch eine weitere Zellart, die eine ausgeprägte phagozytotische und pinozytotische Aktivität zeigt. Es sind die sogenannten Mesangiumzellen, die im Zentrum des Kapillarknäuels liegen und von basalmembranartigem Material umgeben sind (Yamada 1955, Latta et al 1960, Farquhar und Palade 1962, Huhn et al 1962, Jones et al 1962, Suzuki et al 1963, Thoenes 1965, Jørgensen 1966, Michielson und Creemers 1967, Galbraith 1971).

Eine Adventitialzellhülle, die normalerweise bei Kapillaren gefunden und als deren Bestandteil betrachtet wird, fehlt (Bruns und Palade 1968).

1.4.1.2. Beteiligung glomerulärer Zellarten.

Aus dem Aufbau der Kapillarwand ist zu ersehen, daß Basalmembranen kein Kondensationsprodukt der bindegewebigen Grundsubstanz sein können, für das man sie lange Zeit gehalten hat (McManus 1948, Gersh und Catchpole 1949, Lillie 1952, Hall 1953, Wislocki und Padykula 1953, Braun-Falco 1964, Graumann 1964), da sie im Glomerulus wie auch an vielen anderen Stellen im Organismus (Pease 1960),

ohne Kontakt zu Bindegewebszellen vorkommen. Daher können nur die unmittelbar angrenzenden Zellen für ihre Synthese verantwortlich sein. Es müssen sich aber nicht notwendigerweise alle glomerulären Zellen an der Membranbildung beteiligen. Aufgrund morphologischer Untersuchungen werden entweder die fibrocytenähnlichen Mesangiumzellen (Thoenes 1961, 1965, Amon und Gayer 1963, Suzuki et al 1963, Gekle und Merker 1966, Kimmelstiel 1966) oder die Endothelzellen (Hall 1953, 1954, Rinehart et al 1953, Cossel et al 1959, Ormos und Solbach 1963, Lannigan et al 1964) oder die Epithelzellen diskutiert (Bergstrand 1957, Spiro 1959, Andres et al 1962, 1970, Kurtz und Feldman 1962, Østerby-Hansen et al 1967, Thoenes 1967, 1969, Østerby 1972).

Die morphologischen Untersuchungen von Walker (1970, 1972, 1973) zeigen jedoch, daß, wie schon früher gefordert (Farquhar et al 1961, Kurtz 1958, Vernier und Birch-Andersen 1962), sowohl Epithel- als auch Endothelzellen Anteile zur Basalmembran liefern, an ihrem gesamten Regenerierungsprozeß aber alle glomerulären Zellarten beteiligt sind. Durch Beobachtung des Clearancevorganges von in vivo eingelagerten Silberkörnern, die fest an das Membranmaterial gebunden werden (Walker 1972 c), konnte er nachweisen, daß hauptsächlich zwei Komponenten am Aufbau der Basalmembranen beteiligt sind. Ein Anteil wird durch die Fußfortsätze der Epithelzellen sezerniert, und es findet dann eine langsame zentripetale Wanderung des neugebildeten Basalmembranmaterials von der Lamina rara externa mit Verzögerung in der Lamina densa zur Lamina rara interna statt, um anschließend in den Mesangiumzellen abgebaut zu werden. Die zweite Komponente wird von den Endothelzellen sezerniert und wandert am inneren Rand der Lamina densa zu den Mesangiumzellen, um hier ebenfalls abgebaut zu werden. Diese Vorgänge sind nicht auf junge Tiere beschränkt, die noch im Wachstum stehen, sondern finden auch bei ausgewachsenen statt.

1.4.2. Umsatz der Basalmembranen.

Demnach gehören Basalmembranen nicht, wie angenommen (Pierce 1970, Taylor et al 1971), zu den permanenten Strukturen, die über keine

oder nur sehr geringe biologische Erneuerung verfügen. Dies bestätigen auch Markierungsversuche, die bisher vor allem mit radioaktiven Aminosäuren unternommen wurden, und zwar für die glomeruläre Basalmembran in vivo (Lazarow und Speidel 1964, Chow und Drummond 1969, Blau und Michael 1971, Romen et al 1976) und in vitro (Wahl et al 1970, v. Bruchhausen 1971, Cohen und Vogt 1972, 1975, Grant und Harwood 1974, Grant et al 1975, Beisswenger 1976, Williams et al 1976), sowie für die Basalmembran der Linsenkapsel (Grant et al 1972, 1973, Kefalides et al 1976) und des parietalen Dottersacks von Rattenembryonen (Johnson und Starcher 1972, Clark et al 1973, 1975, 1976, Minor et al 1976).

2. Problemstellung

Unter pathologischen und experimentellen Bedingungen sind an den Basalmembranen morphologische Veränderungen feststellbar. Dabei verdienen ihre antigenen Eigenschaften besondere Beachtung (Stebly 1962, 1963, 1965, Krakower und Greenspon 1964, Lerner et al 1967, Unanue und Dixon 1967, Dixon et al 1971, Bach et al 1972, Bläker et al 1972, Wilson und Dixon 1974, Bardos und Muh 1975, Ohnuki 1975). So findet man bei toxisch und immunpathologisch bedingten Nierenerkrankungen, bei Diabetes mellitus und Amyloidose neben einer allgemeinen oder lokalisierten Verdickung auch Verdünnung, Aufsplitterung, Homogenisierung und Fragmentation der Basalmembranen (Fuchs 1966, Gekle und Merker 1966, Vollrath 1968, Østerby-Hansen und Lundbaek 1970, Ashton 1974, Vracko 1974, Churg und Grishman 1975). Es finden aber auch funktionelle Veränderungen statt, die sich in einer erhöhten Permeabilität bemerkbar machen.

Viele Untersuchungen wurden durchgeführt, um diese krankhaften Veränderungen durch Analyse der Basalmembranbestandteile zu erfassen (Kalant et al 1966, Misra und Kalant 1966, Misra und Berman 1968, 1972, Chow und Drummond 1969, Gang und Kalant 1970, Kefalides und Forsell-Knott 1970, Beisswenger und Spiro 1970, 1973, Blau und Michael 1971, 1972, Spiro und Spiro 1971 b, Chiu und Drummond 1972, Cohen und Vogt 1972, Fung und Kalant 1972, Kilo et al 1972, Mahieu 1972, Beisswenger 1973, 1976, Blau und Haas 1973, Westberg und Michael 1973, Kefalides 1974, Lui und Kalant 1974, Bartlett et al 1975, Klein et al 1975, Grant et al 1976, Spiro 1976, Westberg 1976).

Die Befunde einzelner Arbeitsgruppen konnten jedoch nur in den seltensten Fällen auch von anderen bestätigt werden, so daß bis heute keine eindeutige Aussage darüber zu machen ist, welche Umwandlungen Basalmembranen im molekularen Bereich bei den verschiedenen Krankheiten erfahren.

Diese Diskrepanzen dürften einerseits durch die Präparationsmethoden verursacht werden, da es unmöglich ist, absolut reine

Basalmembranen zu erhalten. Es ist aber auch nicht auszuschließen, daß sie bei Einwirkung von Ultraschall, der am häufigsten angewandten Präparationstechnik, abhängig von Dauer und Intensität der Beschallung, mehr oder weniger zerstört werden, so daß bei ihrer Isolierung Membranbestandteile verloren gehen können. Andererseits ist der dynamische Aspekt in der Bildung der Basalmembran nicht genügend berücksichtigt worden. Möglicherweise werden die krankhaften Veränderungen der Basalmembranen durch Störung ihrer Biosynthese und/oder ihres Katabolismus hervorgerufen. Sowohl Auf- als auch Abbau können aber in den verschiedenen Stadien und je nach Ätiologie der Krankheit durchaus unterschiedlich beeinflusst werden.

Die Experimente, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt werden, sind als Versuch zu verstehen, unsere biochemischen Kenntnisse vom Normalstatus der Basalmembranen zu erweitern und Voraussetzungen für die Bearbeitung dynamischer Aspekte zu schaffen.

Ausgewählt wurde die renale glomeruläre Basalmembran, da man relativ einfach und in guter Ausbeute Glomeruli, die einerseits Basalmembranen in großer Menge, andererseits aber auch die membranbildenden Zellen enthalten, durch Siebung aus dem Cortex der Niere gewinnen kann. Die mit diesem Verfahren isolierten Glomeruli sind über lange Zeit stoffwechselaktiv (Fong und Drummond 1968, 1969, Wahl et al 1970, v. Bruchhausen 1971, Gregoire 1975), so daß mit ihnen auch Versuche zur Biosynthese der Basalmembranen durchgeführt werden können.

Aufschluß über die Biosynthese der Basalmembranen soll erhalten werden, indem nach Inkubation der Glomeruli mit verschiedenen radioaktiven Substanzen untersucht wird, ob und wie sie zur Bildung von Membranbestandteilen verwendet werden. Untersucht wird vor allem die Verwertung von Glukose, da nach unseren heutigen Kenntnissen bei der Biosynthese von Glykoproteinen sich alle wesentlichen Bausteine von ihr herleiten.

Da die Basalmembranen nicht nach dem herkömmlichen Verfahren gewonnen werden, sondern nach der relativ schonenden Methode

von v. Bruchhausen und Merker (1965 a), ist es möglich, den Einfluß der Präparationstechnik auf ihre chemische Zusammensetzung abzuschätzen. Bei diesem Verfahren werden die Glomeruli durch Homogenisation anstatt durch Ultraschall zerquetscht und anschließend über einen Saccharosegradienten zentrifugiert, wobei sich die Basalmembranen als Sediment absetzen.

Die so gewonnenen Basalmembranen enthalten Lipide, die als Membranbestandteil angezweifelt werden. Es soll daher untersucht werden, ob sie durch Verunreinigung der Präparation mit zellulären Partikeln verursacht werden. Dazu wird die Zusammensetzung der Lipide der Basalmembranen mit denen der übrigen glomerulären Bestandteile verglichen, die sich durch Zentrifugation des Überstands als glomeruläre Zellfraktion gewinnen lassen. Sollten die Lipide in den Basalmembranen Verunreinigungen sein, so müßte die Mengenverteilung der einzelnen Lipidklassen mit der der glomerulären Zellfraktion übereinstimmen oder nicht reproduzierbaren Schwankungen unterliegen.

Ob die Lipide Bestandteil der Basalmembranen sind, dürfte auch ein Vergleich der Bildungsarten zeigen, da Lipide verschiedener zellulärer Strukturen nicht notwendigerweise gleich schnell umgesetzt werden. Es soll daher untersucht werden, wie Glomeruli radioaktives Acetat und Glycerin, also die eigentlichen Vorstufen bei der Biosynthese von Lipiden, zur Bildung der Lipide der Basalmembranen und der glomerulären Zellfraktion verwerten.

Die Auftrennung der Basalmembranen in die einzelnen Proteinbestandteile ist bisher noch nicht befriedigend gelöst. Daher wird auch versucht, die Bausteine durch selektive Extraktion der Basalmembranen oder durch geeignete Trennverfahren aus gelösten, also ohne Einwirkung von proteolytischen Enzymen, zu isolieren. Zur Charakterisierung wird auch die Verwendung der angebotenen $[U-^{14}C]$ -Glukose bei ihrer Biosynthese verfolgt.

3. Material und Methoden

Soweit nicht anders angegeben, werden Chemikalien der Firma Merck, Darmstadt, und radioaktive Substanzen der Firma Amersham Buchler, Braunschweig-Wenden, verwendet.

3.1. Gewinnung der Glomeruli

(Modifiziert nach: Spire 1967 a)

Die Nieren werden den Rindern unmittelbar nach Schlachtung entnommen und in Eis, das man aus glukosehaltiger (0,55 mM) isotoner Kochsalzlösung (Lösung A) bereitete, ins Labor gebracht. Man trennt den Cortex von der Medulla und zerkleinert ihn grob mit einem Fleischwolf. Die Medulla wird verworfen. Die zerkleinerte Rinde wird maschinell (Schema des Apparates Abb. 2) mit einem rotierenden Stempel unter leichtem Druck ($0,104 \text{ kp/cm}^2$) und ständigem Spülen mit Lösung A durch ein Stahlsieb gepreßt (Fa. Amelang, Berlin; Maschenweite: $260 \mu\text{m}$). Man verwirft das auf dem Sieb verbleibende Bindegewebe und sammelt den durchpassierten Gewebebrei. Er wird mit Lösung A auf zwei bis drei Liter verdünnt und unter leichtem Schütteln nochmals durch das gleiche Sieb filtriert. Anschließend wird das Filtrat durch ein Sieb mit einer Maschenweite von $100 \mu\text{m}$ gegeben. Auf ihm sammeln sich die Glomeruli. Sie werden nach intensiver Waschung in Lösung A aufgenommen und für zehn Minuten bei 4000 Xg und 4°C zentrifugiert. Man dekantiert den Überstand, suspendiert die sedimentierten Glomeruli in Lösung A und zentrifugiert erneut. Dieser Waschvorgang wird solange wiederholt, bis der Überstand klar bleibt. Der gesamte Isolierprozeß wird unter Kühlung durchgeführt.

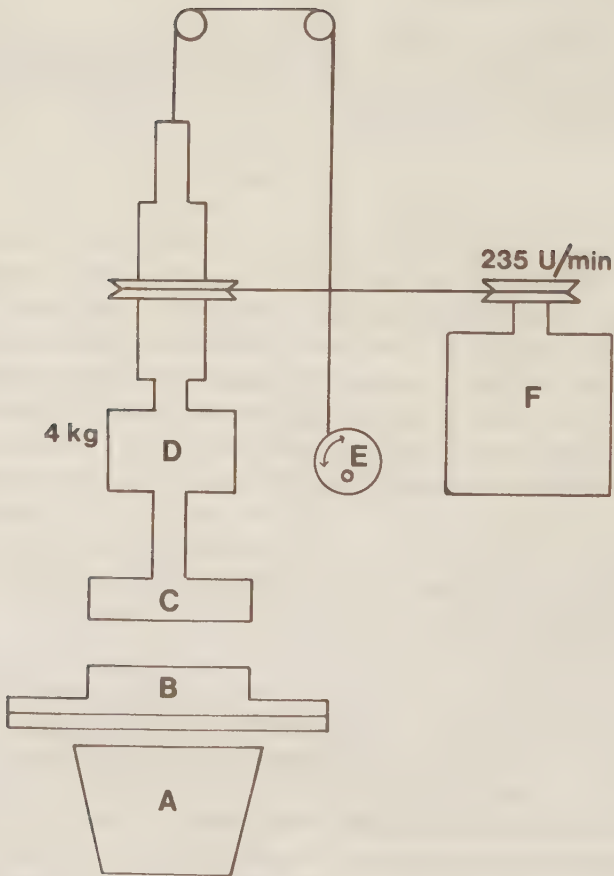


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Apparates zur Isolierung der Glomeruli

A: Sammelgefäß, B: Siebplatte, C: Rotierender Stempel,
D: Gewicht, E: Handkurbel, F: Motor

3.2. Inkubation

Die Glomeruli (20 g Feuchtgewicht) werden in Krebs-Ringer-Phosphatpuffer (KRP-P) pH 7,4 (Umbreit et al 1951) aufgenommen (Endvolumen: 100 ml) und gleichmäßig auf zehn 25 ml-Erlenmeyerkölbchen verteilt. In jedes sind 5 μ mol Glukose, 100 μ Ci $[U-^{14}C]$ -Glukose (268 mCi/mmol) und 55,5 I.E. Penicillin G in einem Gesamtvolumen von 0,3 ml KRP-P vorgegeben. Die Suspension wird zwei Stunden bei 37° C im Schüttelwasserbad (Schüttelfrequenz: 80/min) inkubiert. Nach Ablauf einer Stunde gibt man 5 μ mol Glukose in 0,1 ml KRP-P pro Ansatz nach. Die Inkubation wird durch Zugabe von eiskalter, glukosehaltiger (5,5 mM) physiologischer Kochsalzlösung (10 ml pro Erlenmeyerkölbchen) beendet. Um die Glomeruli vom Medium zu trennen, werden sie zehn Minuten bei 4° C und 4000Xg zentrifugiert. Man wäscht sie anschließend noch zweimal mit eiskalter isotoner Kochsalzlösung.

Die Inkubation mit Acetat und Glycerin erfolgt analog. Anstelle der $[U-^{14}C]$ -Glukose sind hierbei 5 μ Ci $[U-^{14}C]$ -Acetat (59 mCi/mmol) beziehungsweise 5 μ Ci $[U-^{14}C]$ -Glycerin (46 mCi/mmol) pro Ansatz vorgelegt.

Bei den Stoßmarkierungsexperimenten werden jeweils 2 g (Feuchtgewicht) Glomeruli in 10 ml KRP-P suspendiert und entweder mit 100 μ Ci $[U-^{14}C]$ -Glukose, 10 μ Ci $[U-^{14}C]$ -Acetat oder 10 μ Ci $[U-^{14}C]$ -Glycerin für fünfzehn Minuten bei 37° C inkubiert. Sie werden durch kurze Zentrifugation vom Medium getrennt und in Erlenmeyerkölbchen überführt, in denen 5 μ mol Glukose und 55,5 I.E. Penicillin G in 10 ml KRP-P vorgegeben sind. Man inkubiert für weitere zwei Stunden, wobei nach Ablauf von einer Stunde pro Ansatz 5 μ mol Glukose in 0,1 ml KRP-P nachgegeben wird.

3.3. Gewinnung der Basalmembranen

(nach: v. Bruchhausen und Merker 1965 a)
und der glomerulären Zellfraktion

Die Glomeruli werden in 0,32 M Saccharoselösung pH 7,2 aufgenommen und in einem gläsernen Homogenisator nach Potter-Elvehjem homogeni-

siert. Das Homogenat wird mit 0,32 M Saccharoselösung auf 126 ml verdünnt, und jeweils 7 ml dieser Suspension werden einem diskontinuierlichen Gradienten überschichtet, der aus je 4 ml einer 1,8; 1,7; 1,6; 1,5; und 1,4 M Saccharoselösung besteht. Man zentrifugiert eine Stunde bei 55 000Xg (Rotor SW 25, Fa. Beckman, München), vereinigt die sedimentierten Basalmembranen und wäscht sie mit Wasser saccharosefrei. Zur weiteren Reinigung werden sie zweimal für zehn Minuten im Wasserbad bei 37° C mit Desoxyribonuklease (0,1 mg/ml Puffer) in 20 ml 0,2 M Tris/HCl-0,05 M MgSO₄-Puffer pH 7,0 inkubiert.

Die übrige glomeruläre Zellfraktion erhält man durch Zentrifugation der vereinten Überstände der Gradienten, die mit Wasser auf eine Saccharosekonzentration von 0,32 M verdünnt werden, für neunzig Minuten bei 150 000Xg (Rotor 60 Ti, Fa. Beckman, München).

3.4. Isolierung der Lamina densa

(nach: Krakower et al 1957)

Die Basalmembranen (1 g Feuchtgewicht/10 ml Säure) werden nach der DNase-Behandlung in 60-prozentiger (w/v) wässriger Trichloroessigsäure suspendiert und vier Stunden bei Zimmertemperatur gerührt. Man zentrifugiert 30 Minuten bei 20 000Xg und dialysiert den Niederschlag (Lamina densa) und den Überstand (Laminae rarae) fünf Tage gegen Wasser. Beide Fraktionen werden anschließend gefriergetrocknet.

3.5. Kollagenextraktion

(nach: Fitch et al 1955)

Lyophilisierte Basalmembranen (10 mg/ml Säure) werden in 5-prozentiger (w/v) Trichloroessigsäure suspendiert, 15 Minuten unter Rühren bei 90° C gehalten und dann für 20 Minuten bei 4 000Xg zentrifugiert. Man extrahiert den Niederschlag nochmal 30 und 45 Minuten nach dem gleichen Verfahren, engt die vereinten Überstände am Rotationsverdampfer ein und gibt sie über eine Säule (2 x 45 cm) mit Sephadex G 25 (Fa. Pharmacia, Frankfurt/Main). (Elutionspuffer: 0,5 M Essigsäure, Elutionsgeschwindigkeit: 100 ml/h, Fraktionsgröße: 5 ml).

Die proteinhaltigen Fraktionen werden vereint und gefriergetrocknet.

3.6. Reduktion und Alkylierung der Basalmembranen

(nach: Seibles und Weil 1967)

100 mg (Trockengewicht) entfetteter Basalmembranen werden in 25 ml 0,5 M Tris/HCl Puffer pH 8,0 suspendiert, der 5 % (w/v) Natriumdodecylsulfat enthält. Man gibt 1,2 ml Mercaptoäthanol zu, rührt die Suspension 24 Stunden bei 50° C unter Stickstoffatmosphäre und setzt dann unter weiterem Rühren portionsweise Acrylnitril (Gesamtmenge: 2,3 ml) zu. Bei Zugabe des Acrylnitrils muß der pH-Wert kontrolliert und zwischen pH 7,5 und 8,0 gehalten werden. Die Mischung wird noch zwei Stunden bei Zimmertemperatur gerührt und anschließend 15 Minuten bei 4 000Xg und 4° C zentrifugiert. Man dialysiert den Überstand 72 Stunden gegen 0,01 % (w/v) Natriumazid in Wasser und lyophilisiert, um die gelösten Anteile der Basalmembranen zu erhalten.

3.7. Entfernung des Natriumdodecylsulfats

(nach: Weber und Osborn 1969)

10 mg der getrockneten Proteinfraction werden in einem ml Wasser aufgenommen und das Protein durch Zugabe von 9 ml Aceton gefällt. Man läßt die Probe über Nacht in der Kälte stehen und zentrifugiert sie dann 15 Minuten bei 4000Xg und 4° C. Der Überstand wird dekantiert, der Niederschlag einmal mit 10 ml eiskaltem 90-prozentigem (v/v) wässrigem Aceton gewaschen, in wenig Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet.

3.8. Gelchromatographische Auftrennung der Basalmembranen an CPG-10/500, Controlled-Pore Glass

10 mg der reduzierten und alkylierten Basalmembranen werden in 5 ml 0,04 M Phosphatpuffer pH 7,2 gelöst, der 0,02 % (w/v) Natriumazid und 1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat enthält, und auf eine Säule (2 x 100 cm) gegeben, die gefüllt ist mit CPG-10/500 (Fa. Serva, Heidelberg) in einem Puffer aus 0,04 M Phosphat, 0,02 % (w/v)

Natriumazid und 0,1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat, pH 7,2. Man eluiert mit dem gleichen Puffer und sammelt bei einer Laufgeschwindigkeit von 15 ml/h 150 Fraktionen zu 2,5 ml (80 Tropfen). Die Auftrennung wird durch Messung der Absorption der Fraktionen bei 260 nm verfolgt. Die Fraktionen, die einen Absorptionsgipfel bilden, werden vereint, 72 Stunden gegen Wasser dialysiert und gefriergetrocknet.

3.9. Gelelektrophoretische Auftrennung der Basalmembranen (modifiziert nach: Maizel Jr. 1971)

Zur Gelelektrophorese werden ein 7,5 prozentiges Trenngel (Länge: 8 cm) und ein 3 prozentiges Sammelgel (Länge: 1,5 cm) in einem Röhrchen (0,5 x 13 cm) polymerisiert unter Verwendung folgender Stammlösungen:

- 1) 30 g Acrylamid und 0,8 g N,N'-Methylen-bis-Acrylamid auf 100 ml Wasser
- 2) 20 g Acrylamid und 1 g N,N'-Methylen-bis-Acrylamid auf 100 ml Wasser
- 3) 10 g Natriumdodecylsulfat auf 100 ml Wasser
- 4) 0,1 g Ammoniumperoxidisulfat in 0,9 ml Wasser
- 5) 48 ml 1N HCl und 36,3 g Tris auf 100 ml Wasser, pH 8,9
- 6) 25,6 ml 1 M Phosphorsäure und 5,7 g Tris auf 100 ml Wasser, pH 7,2

Gemischt werden in der angegebenen Reihenfolge

A: für das Trenngel

- 2,50 ml Lösung 1
- 1,25 ml Lösung 5
- 0,10 ml Lösung 3
- 0,005 ml N, N, N', N'-Tetramethyl-äthylendiamin
- 6,10 ml Wasser
- 0,10 ml Lösung 4

B: für das Sammelgel

- 1,00 ml Lösung 2
- 1,25 ml Lösung 6
- 0,10 ml Lösung 3
- 0,005 ml N, N, N', N'-Tetramethyl-äthylendiamin

7,54 ml Wasser

0,10 ml Lösung 4

Probenbereitung

1 mg Basalmembran und 4 mg Natriumdodecylsulfat werden mit 1 ml der 1:8 verdünnten Stammlösung 6 und 0,1 ml Mercaptoäthanol versetzt und über Nacht bei 50° C gehalten. Nach Zentrifugation werden 0,15 ml des Überstands mit 0,05 ml Glycerin und 0,005 ml einer 0,001 % (w/v) wässrigen Lösung von Bromphenolblau gemischt und auf das Gel gegeben. Man überschichtet vorsichtig mit Elektrodenspuffer (0,39 M Glycin/-0,05 M Tris, pH 8,3) und läßt die Elektrophorese mit einer Stromstärke von 3 mA/Gel, wobei die Kathode oben und die Anode unten am Röhrchen angelegt ist, so lange laufen, bis die Farbmarkierung etwa 1 cm vor dem Gelende angekommen ist.

Fixierung, Färbung und Entfärbung

Das Gel wird vorsichtig aus dem Röhrchen gelöst, über Nacht in Methanol/Wasser/Eisessig (50:50:7, v/v) fixiert und dann 24 Stunden mit einer 0,2 % (w/v) Lösung von Coomassie Brilliant Blau in Methanol/Wasser/Eisessig (50:50:7, v/v) angefärbt. Die überschüssige Farbe wird durch Waschen über mehrere Tage mit Methanol/Wasser/Eisessig (5:88:7, v/v) entfernt. Das Gel wird mit einem Gel-Scanner (Fa. Zeiss, Oberkochen) photometrisch bei 590 nm vermessen.

3.10. Radioaktivitätsbestimmung

Die Radioaktivität wird mit einem Flüssig-Szintillations-Zähler (Tri-Carb Mod. 3380, Fa. Packard, Berlin) gemessen. Als Szintillationsflüssigkeit, in die wässrige Proben direkt, Proteine erst nach ihrer Auflösung (Soluene 350, Fa. Packard, Berlin) eingebracht werden können, wird eine Lösung von 60 g Naphthalin, 100 ml Methanol, 20 ml Äthylenglykol, 4,0 g des Primär-Szintillators 2,5-Diphenyl-oxazol (PPO) und 0,2 g des Sekundär-Szintillators p-Bis-5-phenyloxazolyl-(2)-benzol (POPOP) in einem Liter Dioxan verwendet (Bray 1960). Bei Proben in organischen Lösungsmitteln werden, da sie stören können, vor der Messung die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen.

Die absoluten Zerfallsraten werden über die Externe-Standard-Kanalverhältnis-Methode (ESKV) bestimmt. Durch Aufnahme einer Eichkurve mit Proben bekannter Radioaktivität, die eine zunehmende Menge Quencher enthalten, erhält man eine definierte Beziehung zwischen Zählrausbeute und ESKV, aus der sich die absolute Radioaktivität in der unbekannten Probe entnehmen läßt (Herberg 1965).

3.11. Lipidanalysen

3.11.1. Extraktion der Lipide

(nach: Bligh und Dyer 1959)

100 mg (Feuchtgewicht) der Basalmembranen oder der übrigen glomerulären Zellfraktion werden in 7,5 ml Methanol/Chloroform (2:1, v/v) aufgeschlämmt und eine Stunde bei Zimmertemperatur gerührt. Man zentrifugiert die Suspension bei 4000Xg 15 Minuten, sammelt den Überstand und extrahiert den Niederschlag nochmals eine Stunde mit 9,5 ml Methanol/Chloroform/Wasser (10:5:4, v/v). Die in einem Scheidetrichter vereinten Überstände werden mit je 5 ml Chloroform und Wasser versetzt und sorgfältig gemischt. Nach der Trennung entnimmt man die untere Chloroformphase, die die Lipide enthält, verdünnt sie mit 5 ml Benzol und zieht am Rotationsverdampfer ab. Die Lipide werden in einem bekannten Volumen Methanol/Chloroform (1:1, v/v) gelöst und bei -4°C unter N_2 aufbewahrt.

3.11.2. Quantifizierungen

Die Lipidklassen - Neutrallipide, Phosphatide, Cholesterin - werden im Gesamtextrakt und nach Trennung mit Biochemica-Test-Kombinationen quantifiziert, wobei im einzelnen nach den Vorschriften der Firma Boehringer, Mannheim, verfahren wird:

Der Gehalt an Gesamtlipid, sowohl im Extrakt als auch in nicht entfetteten Basalmembranen, läßt sich durch die Farbreaktion mit Sulphophosphovanillin ermitteln (Zöllner und Kirsch 1962).

Neutrallipide werden indirekt quantifiziert durch die enzymatische Bestimmung des Glycerins, das man durch Hydrolyse mit 0,5 N äthanolischer Kalilauge freisetzt (Eggstein 1966, Eggstein und Kreutz

1966, Schmidt und v. Dahl 1968). Zur Bestimmung der Phosphatide werden die Lipide mit Perchlorsäure und Wasserstoffperoxid verascht und das entstehende anorganische Phosphat wird dann mit Ammoniumvanadat und Ammoniummolybdat zu einem Farbkomplex umgesetzt (Zilvermit und Davis 1950).

Cholesterin wird über den Farbkomplex quantifiziert, der sich mit Essigsäureanhydrid und konz. Schwefelsäure bildet (Zak et al 1954, Leffler 1959, Watson 1960).

3.11.3. Trennung der Lipide

(nach: Carlson und Waldström 1959)

Zur Trennung in die einzelnen Lipidklassen löst man den Gesamt-extrakt in wenig Chloroform (1,5 bis 2 ml) und gibt ihn auf eine Säule (0,5 cm i.D.), die 1 g Kieselgel 60 (70 bis 250 mesh, Fa. Merck, Darmstadt) in Chloroform enthält. Bei einer Fließgeschwindigkeit von ca 30 ml/h eluiert man die neutralen Lipide einschließlich des Cholesterins mit 25 ml Chloroform und anschließend die Phosphatide mit 25 ml Methanol.

Während zur quantitativen Bestimmung der Lipidklassen die Fraktionen direkt benutzt werden können, muß zur Radioaktivitätsmessung in der Chloroformfraktion das Cholesterin von den Acylglyceriden getrennt werden. Dazu wird es als Digitonid gefällt (Zlatkis et al 1953, Courchainé et al 1959): Man dampft 5 ml des Chloroformeluats zur Trockne ein, nimmt in 5 ml Aceton/Äthanol (1:1, v/v) auf und versetzt mit 5 ml einer einprozentigen (w/v) Digitoninlösung (in Äthanol/Wasser 1:1, v/v). Nach fünfzehn Minuten bei Raumtemperatur wird der Niederschlag abzentrifugiert, erst mit 5 ml Äther/Aceton (1:1, v/v) und dann noch zweimal mit je 5 ml Äther gewaschen.

Zur Radioaktivitätsmessung werden Aliquote der vereinten Überstände sowie des in Eisessig gelösten Niederschlags eingesetzt.

Die Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung auf Glycerin und Fettsäuren erfolgt nach alkalischer Hydrolyse der Lipide. Dazu werden die Methanol- sowie die cholesterinfreie Chloroformfraktion zur Trockne eingedampft, mit 2 ml 2 N Kaliumhydroxid in

Äthanol/Wasser (1:1, v/v) versetzt und über drei Stunden bei 100° C verseift. Man verdünnt die Probe mit einem ml Wasser, säuert mit 6 N Schwefelsäure an und extrahiert sie viermal mit je 3 ml Petroläther 40/60. Die vereinten Petrolätherextrakte enthalten die freien Fettsäuren, während das Glycerin in der wässrigen Phase verbleibt (Dittmer und Wells 1969).

3.12. Zuckeranalysen

3.12.1. Hexosen (Galaktose, Glukose und Mannose)

Die Hexosen werden durch Hydrolyse der Basalmembranen, beziehungsweise der Proteinfractionen, mit 2 N Schwefelsäure (2 mg Protein/ml Säure) über fünf Stunden bei 100° C unter Stickstoffatmosphäre freigesetzt (Abb. 3). Man verdünnt das Hydrolysat mit Wasser auf eine Säurekonzentration von 0,4 N und gibt es, um Peptide und Säure zu entfernen (Spiro 1966), über zwei miteinander verbundene Säulen (1 x 10 cm). Die erste enthält 5 g eines Kationenaustauschers (Dowex 50 X 8, H⁺), die zweite 5 g eines Anionenaustauschers (Dowex 1 X 8, formiat). Man wäscht mit 20 ml Wasser nach und dampft die vereinten Eluate bei 40 bis 50° C am Rotationsverdampfer zur Trockne ein. Der Rückstand wird in 0,5 ml einer 0,1 M Borsäure aufgenommen, deren pH-Wert mit Natronlauge auf 7,2 eingestellt ist.

Die entstehenden Zucker-Boratkomplexe werden durch Ionenaustauschchromatographie in die einzelnen Monosaccharide getrennt (Khym und Zill 1952, Lee et al 1971). Sie werden in der Reihenfolge Mannose, Galaktose, Glukose von einer Säule (0,6 x 30 cm), die mit einem feinkörnigen (20 um) Anionenaustauscher (Aminex A 15, Fa. Bio-Rad, München) gefüllt ist, bei 50° C mit einer Fließgeschwindigkeit von 60 ml/h unter Druck (10 atm.) durch einen Gradienten eluiert. Der Gradient wird in einem zweikammrigen Mischgefäß aus 115 ml 0,1 M Boratpuffer (pH 7,2 mit NaOH) und 185 ml 0,35 M Boratpuffer (pH 10,0 mit NaOH) hergestellt. Man sammelt Fraktionen von 1,5 ml (23 Tropfen), von denen 0,5 ml zur Quantifizierung mit 1,5 ml Orcinreagenz (Winzler 1955) umgesetzt werden. Die Gesamtmenge an Zucker ergibt sich durch Summierung der Einzelwerte in den entsprechenden Fraktionen. Aufgrund der unterschiedlichen

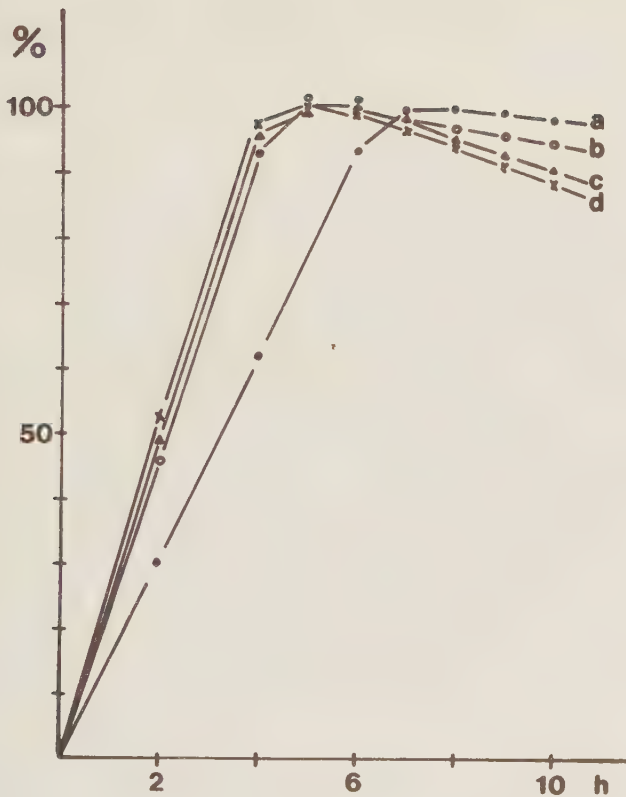


Abbildung 3: Hydrolysekurve zur Freisetzung einzelner Zucker.

a= Fucose mit 0,1 N H_2SO_4 bei 100°C

b= Galaktose,

c= Glukose,

d= Mannose mit 2N H_2SO_4 bei 100°C

Extinktionskoeffizienten muß man für jeden Zucker eine eigene Eichreihe aufnehmen. Optimale Trennung erhält man im Bereich von 10 bis 100 µg für jedes Monosaccharid.

Zur Radioaktivitätsmessung werden jeweils 0,25 ml den Fraktionen eines Zuckers entnommen, vereint und gefriergetrocknet. Man löst den Niederschlag in wenig Wasser und versetzt mit Szintillationsflüssigkeit.

3.12.2. Fucose und Sialinsäure

Fucose wird durch Hydrolyse mit 0,1 N Schwefelsäure über sechs Stunden bei 100° C freigesetzt (Abb. 3). Aus dem Hydrolysat werden Peptide und Schwefelsäure wie bei den Hexosen beschrieben entfernt. Man löst den Rückstand in Pyridin und trennt die Fucose von eventuell mit freigesetzten Hexosen dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel-Fertigplatten (Fa. Merck, Darmstadt), die mit Acetonitril/Schwefelkohlenstoff/Wasser (17:1:2, v/v) entwickelt werden (Wiele und Horak 1970). Die Laufhöhe wird durch Cochromatographie eines Standards bestimmt und mit Anisaldehydsprühareagenz (Stahl und Kaltenbach 1961) sichtbar gemacht. Die fucosehaltige Schicht wird von der Platte entfernt und zur Radioaktivitätsmessung in Szintillationsflüssigkeit suspendiert, beziehungsweise zur quantitativen Bestimmung der Fucose mit Cystein-Schwefelsäure umgesetzt (Dische und Shettles 1948). Die freie Sialinsäure erhält man durch Hydrolyse mit 0,1 N Schwefelsäure bei 80° C über eineinhalb Stunden. Zu ihrer Isolierung wird das Hydrolysat zentrifugiert, der Niederschlag zweimal mit wenig Wasser gewaschen und die vereinten Überstände in eine Säule (1 x 10 cm) überführt, die 3 g eines Anionenaustauschers (Dowex 1 X 8, formiat) enthält. Man wäscht die Säule mit 5 ml Wasser, das verworfen wird, und eluiert anschließend die Sialinsäure mit 40 ml 0,3 N Ameisensäure (Spiro und Spiro 1965). Das Eluat wird lyophilisiert und der Rückstand in einem bestimmten Volumen Wasser aufgenommen. Aliquote werden zur Radioaktivitätsmessung und zur Quantifizierung mit Thiobarbitursäure (Warren 1959) eingesetzt.

Zur Kontrolle werden direkt, also ohne Hydrolyse und Isolierung, Fucose mit Cystein-Schwefelsäure (Dische und Shettles 1948), Sialinsäure mit Resorcin (Svennerholm 1957) und der Neutralzuckergehalt (Mannose, Galaktose, Glukose und Fucose) mit der Anthronreaktion (Roe 1955) bestimmt.

3.12.3. Hexosamine

Durch Hydrolyse mit 4 N Salzsäure über acht Stunden bei 100° C unter Stickstoffatmosphäre setzt man die Hexosamine frei. Die Säure wird bei 50° C am Rotationsverdampfer abgezogen, der Rückstand in 0,5 bis 1 ml 0,3 N Salzsäure aufgenommen und in eine Säule (1 x 30 cm) überführt, die mit einem Kationaustauscher (Dowex 50 X 8, H⁺) gefüllt ist. Man eluiert die Hexosamine, wobei gleichzeitig eine Trennung in die einzelnen Aminosucker erfolgt, mit 100 ml 0,3 N Salzsäure bei einer Fließgeschwindigkeit von 10 ml/h (Gardell 1953). Es werden Fraktionen von 2,5 ml (40 Tropfen) gesammelt. Den Fraktionen werden Aliquote zur Quantifizierung nach Elson-Morgan (1933) entnommen. Die vereinten Fraktionen eines Aminosuckers werden zur Trockne eingedampft, in wenig Wasser aufgenommen und zur Radioaktivitätsbestimmung eingesetzt.

3.13. Bestimmung von RNA, DNA und Hydroxyprolin

Der Ribonukleinsäuregehalt der Basalmembranen wird nach einstündiger Hydrolyse mit 0,3 N Kalilauge mit der Orcinreaktion bestimmt (Mejbaum 1939).

Die Desoxyribonukleinsäure läßt sich nach ihrer Extraktion mit 0,5 N Perchlorsäure bei 90° C über 15 Minuten durch die Farbreaktion mit Diphenylamin bestimmen (Burton 1956, Croft und Lubran 1965).

Zur Quantifizierung des Hydroxyprolins hydrolysiert man Basalmembranen mit 6 N Salzsäure bei 100° C über 18 Stunden, oxidiert das Hydrolysat mit Chloramin T und setzt mit Ehrlichs-Reagenz um (Stegemann 1958).

4. Ergebnisse

4.1. Stoffwechselaktivität der Glomeruli

Durchschnittlich können mit dem Siebverfahren aus den Cortexabschnitten von drei Rindernieren eine Glomerulifraktion von 20 g (Feuchtgewicht) isoliert werden. Sie besteht, wie lichtmikroskopische Untersuchungen zeigen, mindestens zu 95 % aus Glomeruli, die teilweise noch ihre Bowmansche Kapsel besitzen und enthält nur geringe Anteile an Tubuli. Die Glomerulifraktion ergibt zwischen 300 und 500 mg (Trockengewicht) Basalmembranen, deren DNA- und RNA-Gehalt unter einem Prozent liegt.

Zum überwiegenden Teil besteht die renale glomeruläre Basalmembran aus Proteinen (ca 87 %). Weiterhin enthält sie Lipide (ca 4 %) und Kohlenhydrate (ca 8 %). Nicht nachweisbar sind Glykolipide, Uronsäuren und Sulfat. Auffallend hoch ist mit $6,5 \pm 0,2$ % (n=9) ihr Gehalt an Hydroxyprolin, einer Aminosäure, die für Kollagene charakteristisch ist. Die isolierten Glomeruli sind innerhalb der Inkubationszeit von zwei Stunden stoffwechselaktiv. Sie synthetisieren in diesem Zeitraum, wie vermutet, aus den angebotenen radioaktiven Substanzen auch Basalmembranen, denn die anschließend präparierten Membranen sind deutlich markiert (Abb. 4). Inkubiert man die Glomeruli mit $[U-^{14}C]$ -Glukose (1 mCi, 268 mCi/mMol), aus der sich bekanntlich alle Zucker von Glykoproteinen herleiten, so werden innerhalb der zwei Stunden 0,02 bis 0,05 % der angebotenen Radioaktivität in die Basalmembranen eingebaut (Tab. 3). Je nach Präparation erreichen sie dabei spezifische Aktivitäten zwischen 800 und 2 000 dpm/mg GBM. Bietet man dagegen die Lipidvorstufen $[U-^{14}C]$ -Glycerin (50 uCi, 46 mCi/mMol) oder $[U-^{14}C]$ -Acetat (50 uCi, 59 mCi/mMol) an, so werden bei beiden Substraten nach gleicher Inkubationszeit zwischen 0,2 und 0,5 % der vorgegebenen Aktivität in den anschließend gewonnenen Basalmembranen wiedergefunden (Tab. 3), was zu spezifischen Aktivitäten von 500 bis 800 dpm/mg GBM führt. Wie die Streuung der Werte zeigt, haben die verschiedenen Präparationen recht unterschiedliche Stoffwechselaktivitäten. Deshalb wird weitgehend, um die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können,

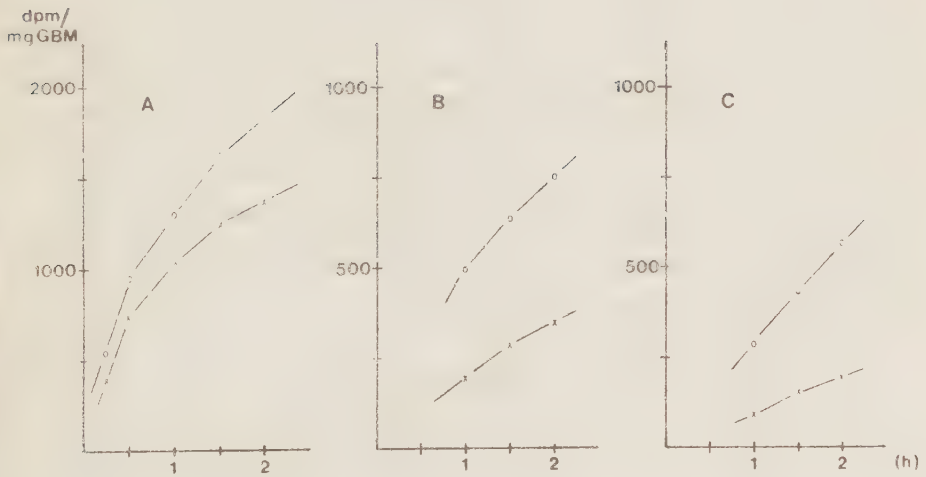


Abbildung 4: Zeitverlauf der Radioaktivitätsaufnahme in Basalmembranen nach Inkubation von isolierten Glomeruli mit

- A: $\text{U-}^{14}\text{C}$ -Glukose,
 B: $\text{U-}^{14}\text{C}$ -Glycerin,
 C: $\text{U-}^{14}\text{C}$ -Acetat.

Basalmembranen mit (o) und ohne (x) Lipide.

auf die Angabe spezifischer Radioaktivitäten verzichtet, und stattdessen die Markierung einzelner Bestandteile als Prozentsatz der Gesamtaktivität der Basalmembranen angegeben. Die Daten entsprechen dem Mittelwert $\pm$ dem mittleren Fehler des Mittelwertes (n = Anzahl der Bestimmungen).

4.2. Lipide

4.2.1. Lipidgehalt der Basalmembranen

Die durch Homogenisation und Gradientenzentrifugation aus isolierten Glomeruli gewonnenen Basalmembranen enthalten pro 100 mg (Trockengewicht) $4,47 \pm 0,25$ mg ($n=9$) Lipide (Tab. 1). Eine nachträgliche Ultraschallbehandlung dieser Basalmembranen reduziert ihren Lipidgehalt auf ca 1,9 %. Die Lamina densa, die man chemisch mit 60 % (w/v) Trichloressigsäure isoliert, enthält dagegen noch 3,6 % Lipide, also die Hauptmenge der ursprünglich vorhandenen. Die Basalmembranlipide setzen sich zusammen aus Glyceriden (13,6 %), Phosphatiden (46,2 %) und aus Cholesterin (37,6 %) (Tab. 1). Freie Fettsäuren werden nicht gefunden.

4.2.2. Radiomarkierung der Basalmembranlipide

Nach Inkubation der Glomeruli mit $[U-^{14}C]$ -Glukose, $[U-^{14}C]$ -Glycerin und $[U-^{14}C]$ -Acetat sind die Lipide ihrer Basalmembranen deutlich markiert. Nach Gabe von Glukose findet man $21,4 \pm 2,0$ % ($n=3$), nach Glycerin und Acetat $71,8 \pm 1,5$ % ($n=3$) beziehungsweise $56,2 \pm 1,4$ % ($n=3$) der gesamt aufgenommenen Radioaktivität in den Lipidkomponenten (Tab. 2).

Die Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen Lipidklassen ist vom Precursor abhängig. Bei Glukose als Precursor sind $71,8 \pm 2,1$ % ($n=3$) der Lipidaktivität in den Neutralfetten und $25,9 \pm 2,2$ % ($n=3$) in der Fraktion der Phosphatide enthalten. Bei Glycerin beträgt der Anteil an der Gesamtaktivität in den Phospholipiden $54,0 \pm 1,0$ % ($n=3$) und in den Neutrallipiden $45,0 \pm 3,1$ % ($n=3$), bei Acetat sind es $55,0 \pm 2,6$ % ($n=3$) (PL) beziehungsweise $32,9 \pm 3,0$ % ($n=3$) (NL). Cholesterin ist nach Inkubation mit

	n	µg/mg GBM	% der Gesamtlipide
GESAMTLIPIDE	9	44,7 ± 0,3	
NEUTRALLIPIDE	9	6,1 ± 0,1	13,6 ± 0,5
PHOSPHOLIPIDE	9	20,7 ± 0,1	46,2 ± 0,5
CHOLESTERIN	9	16,8 ± 0,1	37,6 ± 0,9

Tabelle 1: Mengenverhältnisse der Basalmembranlipide

Glukose und Glycerin mit 1 bis 2 % nur geringfügig, nach Acetat aber mit $10,0 \pm 3,0$ % (n=3) der Gesamtlipidaktivität deutlich markiert (Tab. 2).

Die Mengen der einzelnen Lipidklassen sowie die von ihnen aufgenommene Radioaktivität nach Inkubation der Glomeruli mit verschiedenen Precursoren - die Zahlenwerte gegen die Ergebnisse eines Versuches wieder - sind in Abbildung 5 (A) graphisch dargestellt. Die daraus berechneten spezifischen Aktivitäten zeigt Teil B. Die höchsten Werte erreichen jeweils die Neutrallipide.

Untersucht man die Verteilung der Radioaktivität auf Glycerin- und Fettsäurekomponente, so sind nach Gabe von Glukose und Glycerin ca 80 bis 90 % der aufgenommenen Aktivität im Glycerinanteil der Lipide lokalisiert, während es bei Acetat nur 5 bis 10 % sind.

4.2.3. Lipidgehalt der glomerulären Zellfraktion

Gewinnt man die übrigen glomerulären Bestandteile und bestimmt ihren Lipidgehalt, so liegt er mit $10,8 \pm 0,2$ % (n=6) beträchtlich höher als bei den Basalmembranen. Er setzt sich zu $15,6 \pm 0,9$ % (n=4) aus Neutralfetten, zu $54,0 \pm 1,0$ % (n=4) aus Phospholipiden und zu $30,9 \pm 0,7$ % (n=4) aus Cholesterin zusammen.

4.2.4. Vergleich der spezifischen Aktivitäten der Lipide der Basalmembranen und der glomerulären Zellfraktion

Die Radiomarkierungen der Lipide der glomerulären Zellfraktion sind ebenfalls vom Precursor abhängig, unterscheiden sich aber wesentlich von denen der Basalmembranlipide (Tab. 3). Inkubiert man die Glomeruli mit Glukose, so erhält man je nach Präparation für die Lipide der Basalmembranen spezifische Aktivitäten zwischen 3 500 und 10 000 dpm/mg Lipid. Die entsprechenden Werte für die Lipide der glomerulären Zellfraktion sind dagegen mit 1 200 bis 3 500 dpm/mg nur etwa ein Drittel so hoch. Während bei Glycerinangebot die Basalmembranlipide Markierungen von 8 300 bis 13 400 und bei Acetat von 6 500 bis 10 000 erreichen, betragen sie entsprechend für die Lipide der glomerulären Zellfraktion zwischen 12 000 und 25 000 beziehungsweise zwischen 25 000 und 32 000 dpm/mg

n	% der GBM-Aktivität			% der Lipidaktivität		
	A	B	C	A	B	C
GESAMTLIPIDE	3	21,4 ± 2,0	71,8 ± 1,5	56,2 ± 1,4		
NEUTRALLIPIDE	3			71,8 ± 2,1	45,0 ± 3,1	32,9 ± 3,0
PHOSPHOLIPIDE	3			25,9 ± 2,2	54,0 ± 1,0	55,0 ± 2,6
CHOLESTERIN	3			2,0 ± 0,4	1,0 ± 0,1	10,0 ± 3,0

Tabelle 2: Radioaktivitätsaufnahme beziehungsweise Verteilung auf die einzelnen Klassen der Basalmembranlipide nach Inkubation der Glomeruli mit:

- A: $\overline{U}$ - ^{14}C -Glukose,
 B: $\overline{U}$ - ^{14}C -Glycerin und
 C: $\overline{U}$ - ^{14}C -Acetat

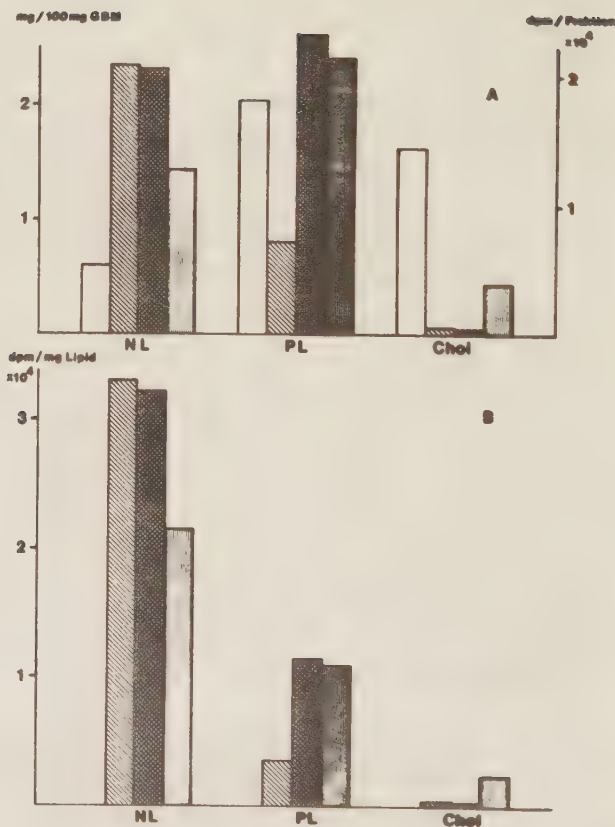


Abbildung 5: A: Mengen-  und Radioaktivitätsverteilung auf die einzelnen Klassen der Basalmembranlipide; (NL= Neutrallipide, PL= Phospholipide und Chol= Cholesterin) nach Inkubation der Glomeruli mit $\bar{U}$ -¹⁴C-Glukose , $\bar{U}$ -¹⁴C-Glycerin  und $\bar{U}$ -¹⁴C-Acetat  B: Die daraus berechneten spezifischen Aktivitäten. Die graphische Darstellung gibt die Einzelwerte eines repräsentativen Versuches wieder.

Lipid. Sie sind somit bei Inkorporation von Glycerin etwa doppelt und bei Acetat sogar viermal so hoch markiert wie die Basalmembranlipide.

4.2.5. Stoßmarkierung

Inkubiert man die Glomeruli fünfzehn Minuten mit und anschließend noch weitere zwei Stunden ohne Zusatz radioaktiver Precursoren, führt also eine echte Stoßmarkierung in Form eines "pulse-chase" Experiments durch, so werden innerhalb der Vorinkubation von den glomerulären Zellen bei Glukose und Glycerin ca 35 % der angebotenen Radioaktivität aufgenommen, bei Acetat aber nur etwa 24 %. Dabei erreichen die Lipide der glomerulären Zellfraktion bei Angebot von Glycerin und Glukose spezifische Aktivitäten von etwa 1 000, bei Acetat aber von 13 000 dpm/mg Lipid. Umgekehrt liegen die Verhältnisse bei den Basalmembranlipiden. Hier betragen die spezifischen Aktivitäten nach Glycerin 5 000, nach Glukose 3 000 und nach Acetat jedoch nur 1 000 dpm/mg Lipid. Die Zahlenangaben sind das Ergebnis eines Experiments (Tab. 4).

4.3. Kohlenhydrate

4.3.1. Zuckergehalt der Basalmembranen

Der Zuckeranteil in den renalen glomerulären Basalmembranen beträgt 8,4 %. Er besteht aus Galaktose (2,6 %), Glukose (2,6 %), Mannose (0,8 %), Fucose (0,6 %), Sialinsäure (0,5 %) und Glukosamin (1,3 %) (Tab. 5).

Der Gehalt an Neutralzuckern beträgt bei Summierung der Einzelwerte nach Hydrolyse und chromatographischer Trennung 6,5 %. Bestimmt man ihn aber direkt mit der Anthronreaktion, so ergibt sich nur $5,2 \pm 0,2$ % (n=11). Dagegen stimmen die Werte der direkten Bestimmung von Fucose ($0,62 \pm 0,03$ %, n=8) mit der Cystein-Schwefelsäure-Reaktion und von Sialinsäure ($0,57 \pm 0,03$ %, n=9) mit Resorcin gut mit den Einzelmessungen überein (Tab. 5). An Hexosaminen läßt sich mit Sicherheit nur Glukosamin nachweisen.

Angebot	% Inkorporation in die GBM	n	spez. Aktivitäten der Lipide GBM	spez. Aktivitäten der Lipide GZF (dpm/mg)
[U- ¹⁴ C]-GLUKOSE	0,02 - 0,05	10	6310 ± 1600	2130 ± 560
[U- ¹⁴ C]-GLYCERIN	0,2 - 0,5	3	10750 ± 2480	21210 ± 4910
[U- ¹⁴ C]-ACETAT	0,2 - 0,5	3	8120 ± 1790	31840 ± 7020

Tabelle 3: Inkorporation (in %) der angebotenen Precursoren und die spezifischen Aktivitäten der Lipide der Basalmembran (GBM) und der glomerulären Zellfraktion (GZF) nach zweistündiger Inkubation der Glomeruli.

Angebot	% Abnahme in 15 Min.	spez. Aktivitäten der Lipide (dpm/mg)
		GBM GZF
[U- ¹⁴ C]-GLUKOSE	35	2980 960
[U- ¹⁴ C]-GLYCERIN	35	5050 960
[U- ¹⁴ C]-ACETAT	24	970 12700

Tabelle 4: Ergebnis des Stosmarkierungsexperiments. Abnahme der Radioaktivität (in %) im Medium während der Vorinkubationszeit (15 Minuten) und die spezifischen Aktivitäten der Lipide der Basalmembranen (GBM) und der glomerulären Zellfraktion (GZF) bei weiterer Inkubation der Glomeruli über 2 Stunden ohne radioaktive Substanzen.

	n	$\mu\text{g}/\text{mg}$ GBM	% der GBM	% der Gesamtzucker
GALAKTOSE	13	$25,9 \pm 0,5$	2,6	30,8
GLUKOSE	13	$25,5 \pm 0,2$	2,6	30,3
MANNOSE	13	$7,7 \pm 0,1$	0,8	9,2
FUCOSE	8	$6,2 \pm 0,3$	0,6	7,4
SIALINSÄURE	8	$5,4 \pm 0,1$	0,5	6,4
GLUKOSAMIN	10	$13,4 \pm 0,1$	1,3	15,9
		S: 84,1		

Tabelle 5: Mengenverteilung der Zucker

4.3.2. Radiomarkierung der Basalmembranzucker

Alle Zucker der Basalmembranen sind nach zweistündiger Inkubation von Glomeruli mit $[U-^{14}C]$ -Glukose deutlich markiert. Die Zuckerfraktion enthält 28,8 % der von den Basalmembranen aufgenommenen Radioaktivität, wobei 54,0 % der Kohlenhydrataktivität auf die Neutralzucker, 6,6 % auf die Sialinsäure und 39,2 % auf Glukosamin entfallen (Tab. 6). Die Mengenverteilung der einzelnen Zucker, sowie die von ihnen aufgenommene Radioaktivität, zeigt Abbildung 6 (oben). Die Zahlen entsprechen dem Ergebnis eines typischen Experiments. Berechnet man daraus die spezifischen Aktivitäten (Abb. 6, unten), so haben Fucose und Glukosamin die höchsten Werte.

Die Zeitabhängigkeit der Radiomarkierung einzelner Zucker kann mit den hier durchgeführten Experimenten nicht bestimmt werden. Bei einer kürzeren Inkubation als zwei Stunden ist die Radioaktivität in den isolierten Monosacchariden nicht meßbar, während eine längere Inkubationsperiode keine veränderte Verteilung der Markierung ergibt.

Zuckernukleotide, die als Zwischenprodukte bei der Verwertung der Glukose auftreten müssen, lassen sich nicht nachweisen. Durch Extraktion mit 0,6 N Perchlorsäure, dem üblichen Isolierungsverfahren, können selbst aus 20 g (Feuchtgewicht) Glomeruli keine meßbaren Mengen gewonnen werden.

4.4. Löslichkeit und Fraktionierung

4.4.1. Gelelektrophorese

Die Basalmembranen lassen sich nach Reduktion mit Mercapto-Äthanol gelelektrophoretisch auftrennen. Dabei zeigen auch verschiedene Präparationen immer die gleichen Trennmuster (Abb. 7). Bei Trennung in einem Natriumdodecylsulfatsystem an 7,5 prozentigen Polyacrylamidgelen ergeben sich achtzehn Proteinbanden (Abb. 8). Die Peptide können mit der Perjodsäure-Schiff-Reaktion angefärbt werden, enthalten demnach alle Zucker. Ihre Molekulargewichte liegen, wie man aus den Rf-Werten abschätzen kann, im Bereich von 20 000 bis 300 000.

	n	% der GBM-Aktivität	% der Zuckeraktivität
GALAKTOSE	13	$2,1 \pm 0,1$	7,3
GLUKOSE	13	$4,7 \pm 0,2$	16,3
MANNOSE	13	$1,4 \pm 0,1$	4,9
FUCOSE	8	$7,4 \pm 0,1$	25,7
SIALINSÄURE	8	$1,9 \pm 0,1$	6,6
GLUKOSAMIN	10	$11,3 \pm 0,4$	39,2
		S: 28,8	

Tabelle 6: Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen Zucker der Basalmembranen nach Inkubation der Glomeruli mit $[U-^{14}C]$ -Glukose

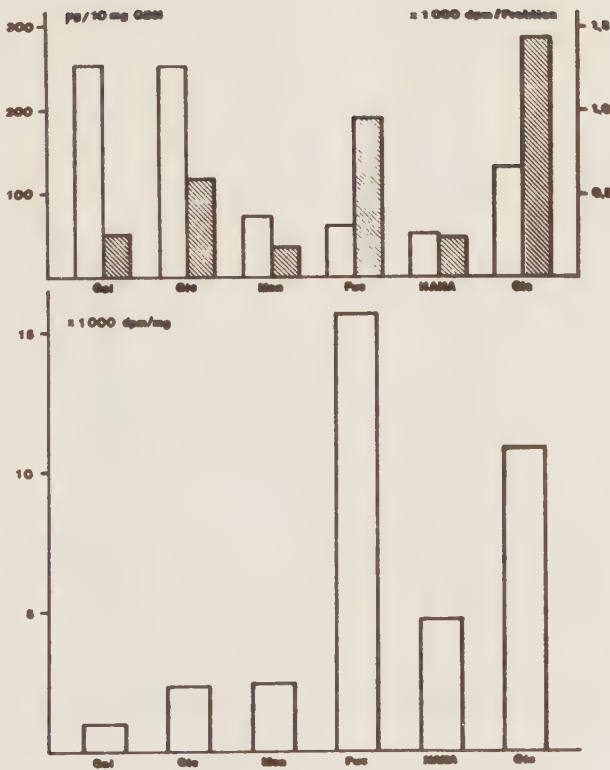


Abbildung 6, oben: Mengenverteilung der Basalmembranzucker , sowie ihre Markierung nach Inkubation von Glomeruli mit $[U-^{14}C]$ -Glukose.

unten: Die daraus berechneten spezifischen Aktivitäten. Die Werte geben die Ergebnisse eines Experiments.

Gal= Galaktose, Glc= Glukose, Man= Mannose, Fuc= Fucose, NANA= Sialinsäure, Gla= Glukosamin

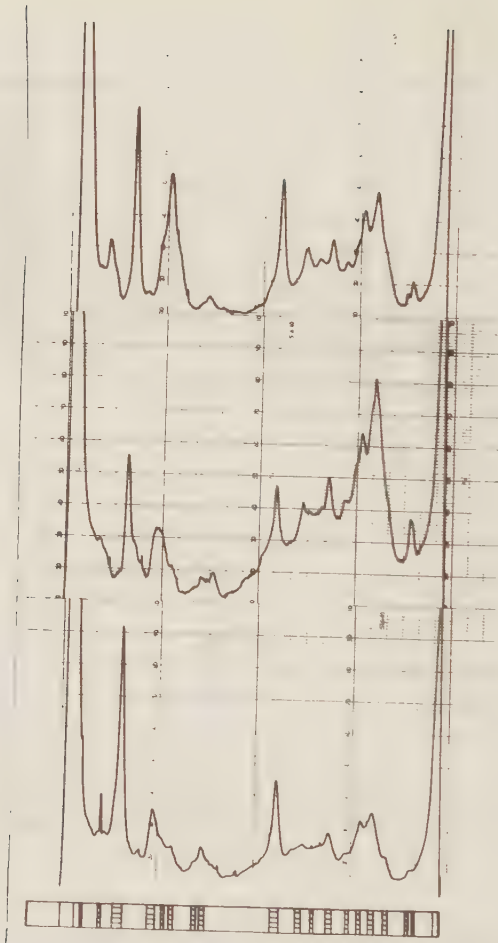


Abbildung 7: Gegenüberstellung der Separationsmuster der geleelektrophoretischen Trennung dreier verschiedener Basalmembranpräparationen

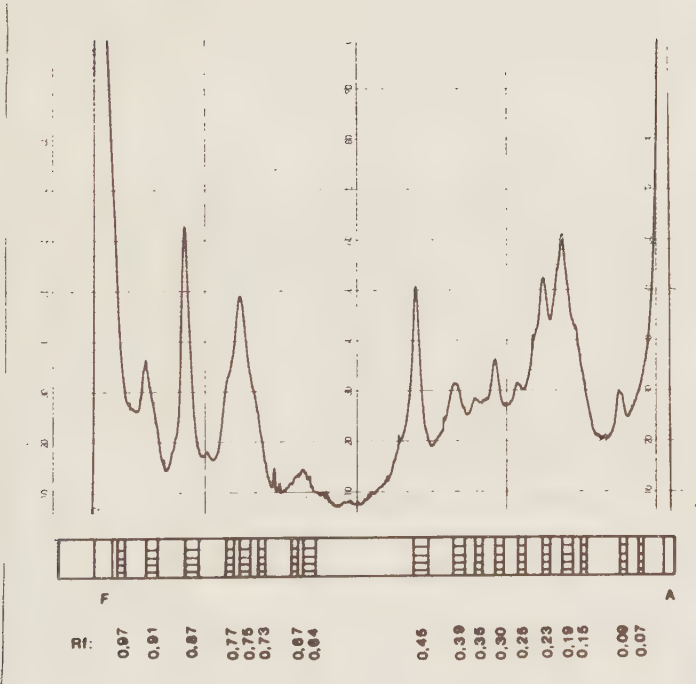


Abbildung 8: Gelelektrophoretische Trennung von reduzierten Basalmembranen an 7,5 % Polyacrylamid in SDS.

A: Gelanfang,

F: Farbmarkierung

Zur Gewinnung dieser Proteinuntereinheiten erweist sich die präparative Gelelektrophorese als praktisch nicht anwendbar. Bedingt durch die geringe Löslichkeit der Basalmembranen im Elektrophoresepuffer kann nur sehr wenig Substanz aufgegeben werden. Da anscheinend auch beträchtliche Mengen der Proteine an das Polyacrylamid gebunden werden, läßt sich anschließend aus den einzelnen Fraktionen, nicht einmal aus den vereinten von zehn Läufen, nicht genügend Material zur weiteren Untersuchung gewinnen.

4.4.2. Löslichkeit

Die glomerulären Basalmembranen des Rinden zeigen eine geringe Löslichkeit (Tab. 7). Sie sind in sauren und neutralen Puffern, auch bei erhöhter Temperatur und einer geringen Membrankonzentration (0,5 bis 1 mg/ml Puffer), praktisch unlöslich. Im Alkalischen, aber nur unter denaturierenden Bedingungen, gehen bis zu 30 % in Lösung. Bei Denaturierung und gleichzeitiger Reduktion mit Mercaptoäthanol können sich bis zu 85 % der Membran lösen, wobei je nach Präparation ein unlöslicher Rest zwischen 15 und 35 % (bezogen auf die Einwaage) bleibt.

Lösungseffekte zeigen dabei nur starke Denaturantien wie Harnstoff oder Guanidiniumchlorid sowie das denaturierend wirkende Detergens Natriumdodecylsulfat. Detergentien wie Triton-X-100 und Natriumdesoxycholat und organische Lösungsmittel wie Pyridin, n-Butanol oder α -Chloräthanol, die mit Erfolg bei der Lösung von Membranproteinen eingesetzt werden, sind praktisch unwirksam.

Reduzierte Basalmembranen, bei denen die Mercaptogruppen durch Alkylierung blockiert sind, zeigen eine deutlich erhöhte Löslichkeit (bis zu 10 mg/ml Puffer, pH-Bereich von 6,0 bis 9,0). Die Puffer müssen jedoch Denaturantien oder eine relativ hohe Salzkonzentration enthalten (z.B. 1,0 M NaCl).

Weder aus den ursprünglichen noch aus den reduzierten und alkylierten Basalmembranen lassen sich durch selektive Lösungsmittel definierte Untereinheiten isolieren. Es gelingt nicht, durch

Puffer	pH	Temperatur °C	Ausbeute (% Trockengewicht)
0,5 M Essigsäure	2,0	4	2
0,2 M Na-Citrat	3,2	4	1
H ₂ O	7,0	25	0
0,067 M K ₂ HPO ₄ 0,067 M KH ₂ PO ₄	7,5	4	2
0,05 M Tris 0,5 M NaCl	7,2	4	1
0,05 M Tris 1,0 M NaCl	7,2	4	10
0,5 M Tris 0,1 Citronensäure 1 M CaCl ₂	8,0	4	25
0,5 M Tris 8 M Harnstoff	8,5	50	30
0,5 M Tris 6 M Guanidiniumchlorid	8,5	50	30
0,5 M Tris 5 % Natriumdodecylsulfat	8,5	50	35
0,5 M Tris 8 M Harnstoff 5 % Mercaptoäthanol	8,5	50	85
0,5 M Tris 5 % Natriumdodecylsulfat 5 % Mercaptoäthanol	8,5	50	85
n-Butanol		4	3
Pyridin		4	5

Tabelle 7: Löslichkeit der Basalmembranen

Phenolextraktion Glykoproteine oder nach der herkömmlichen Methode, mit der es normalerweise aus Geweben extrahiert wird (neutrale Salzlösungen, saure Puffer), Kollagen zu gewinnen. Bei den reduzierten Membranen werden teilweise größere Mengen gelöst.

Alle durch Extraktion isolierten Fraktionen stimmen in ihren analytischen Daten (Kohlenhydratgehalt und Zusammensetzung, Hydroxyprolingehalt) mit dem Ausgangsmaterial überein, sind jedoch meist deutlich höher radiomarkiert (zwischen 20 und 25 %). Gelelektrophoretisch lassen sich nur die unter Reduktion gewonnenen Fraktionen auftrennen, die anderen erst, nachdem auch sie reduziert wurden. In allen Fällen erhält man Trennmuster, die mit denen der Ursprungsbasalmembran identisch sind. Auch der nach Auflösung unter Reduktion verbleibende Rest hat die gleiche chemische Zusammensetzung wie das Ausgangsmaterial. Seine Radiomarkierung ist jedoch von der Präparation abhängig. Sie kann unmeßbar gering sein, aber auch bis zu 20 % der Aktivität der eingesetzten Basalmembranen erreichen. Im Mittel beträgt sie $12,3 \pm 6,3$ % ($n=10$). Im Zuckeranteil des Restes läßt sich Radioaktivität nicht eindeutig nachweisen.

4.4.3. Kollagen

Die Kollagenkomponente (20 bis 35 % vom Ausgangsmaterial) kann durch mehrmalige Extraktion der Basalmembranen mit 5 prozentiger Trichloressigsäure bei 90°C isoliert werden. Ihr Gehalt an Hydroxyprolin beträgt $13,8 \pm 0,4$ % ($n=4$) und an Zuckern $11,6 \pm 0,5$ % ($n=5$). An Zuckern lassen sich nur Glukose ($6,2 \pm 0,3$ % , $n=5$) und Galaktose ($5,3 \pm 0,2$ % , $n=5$) nachweisen.

Die Radiomarkierung des Kollagens beträgt $12,6 \pm 0,6$ % ($n=6$) der Aktivität der eingesetzten Basalmembran. Sie ist ausschließlich auf den Zuckeranteil beschränkt, und zwar entfallen auf die Glukose $64,7 \pm 2,6$ % ($n=5$) und auf die Galaktose $35,4 \pm 1,6$ % ($n=5$) der Kollagenradioaktivität.

4.4.4. Chromatographische Trennung der Basalmembranen

Die reduzierten und alkylierten Basalmembranen lassen sich durch Molekularsiebung auftrennen, wenn die Elutionspuffer Denaturantien enthalten. Die Effektivität der Fraktionierung ist vom Trägermaterial, von der Zusammensetzung der Puffer und der Menge der aufgegebenen Basalmembran abhängig. Werden trishaltige Puffer verwendet, oder die Basalmembranproteine in konzentrierter Lösung auf die Säule gegeben, so wird keine Fraktionierung erreicht. Die einzelnen Fraktionen überschneiden sich, so daß das aufgetragene Material praktisch als ein breiter Gipfel eluiert wird, der sich über den gesamten Fraktionierungsbereich hinzieht.

Bei vernetzten Dextranen (Sephadex) als Trägermaterial treten ähnliche Probleme wie bei der präparativen Gelelektrophorese auf. Auch hier werden die Basalmembranproteine gebunden. Es kann daher bei einem Lauf nicht genügend Substanz zur weiteren Untersuchung gewonnen werden. Bei mehreren Läufen auf der selben Säule kommt es zur Vermischung der Fraktionen, so daß eine eindeutige und reproduzierbare Trennung nicht mehr erfolgt.

Als gutes Trägermaterial erweist sich das zur Gelchromatographie entwickelte poröse Glas (CPG 10, Controlled-Pore Glass). Bei Chromatographie in einem Phosphat-Natriumdodecylsulfat-Puffer an CPG 10/500, das nach Angabe der Hersteller Proteine mit einem Molekulargewicht von 8 000 bis 40 000 auftrennt, ergeben die Basalmembranen vier Fraktionen (Abb. 9). Die gleichen vier Fraktionen werden auch, aber mit geringerer Trennschärfe, mit Puffern eluiert, die anstelle des Detergens Harnstoff oder Guanidiniumchlorid enthalten.

Die einzelnen Fraktionen bestehen, wie die Gelelektrophorese zeigt (Abb. 10), aus mehreren Peptiden. Sie ergeben aber immer das gleiche Muster, das sich nur einem bestimmten Bereich im Trennmuster der Basalmembranen zuordnen läßt. Die Fraktion "1" mit dem höchsten Molekulargewicht dringt nicht in die Gele ein.

Die Fraktionen lassen sich nicht an CPG 10 mit einem anderen Fraktionierungsbereich weiter auftrennen (Abb. 11). Sie können auch nicht, ebenso wie die Originalbasalmembranen, durch

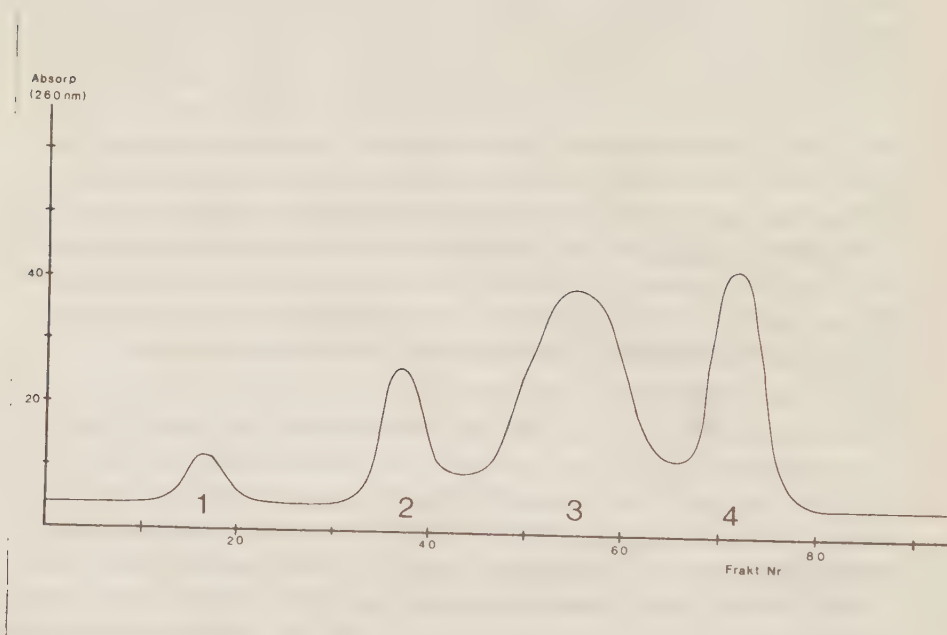


Abbildung 9: Trennung der reduzierten und alkylierten
Basalmembranen an CPG 10/500

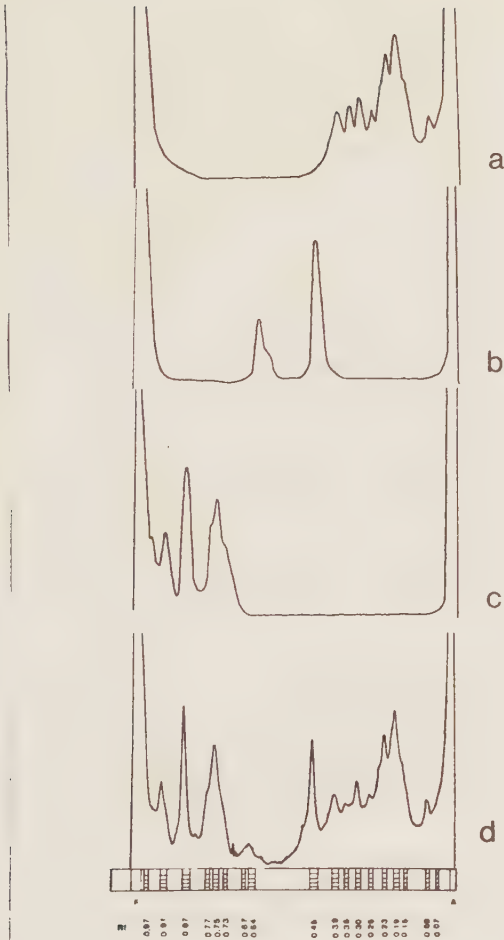


Abbildung 10: Gelelektrophoretische Auftrennung der Fraktionen
a) Frakt. "2", b) Frakt. "3", c) Frakt. "4",
d) Originalbasalmembran

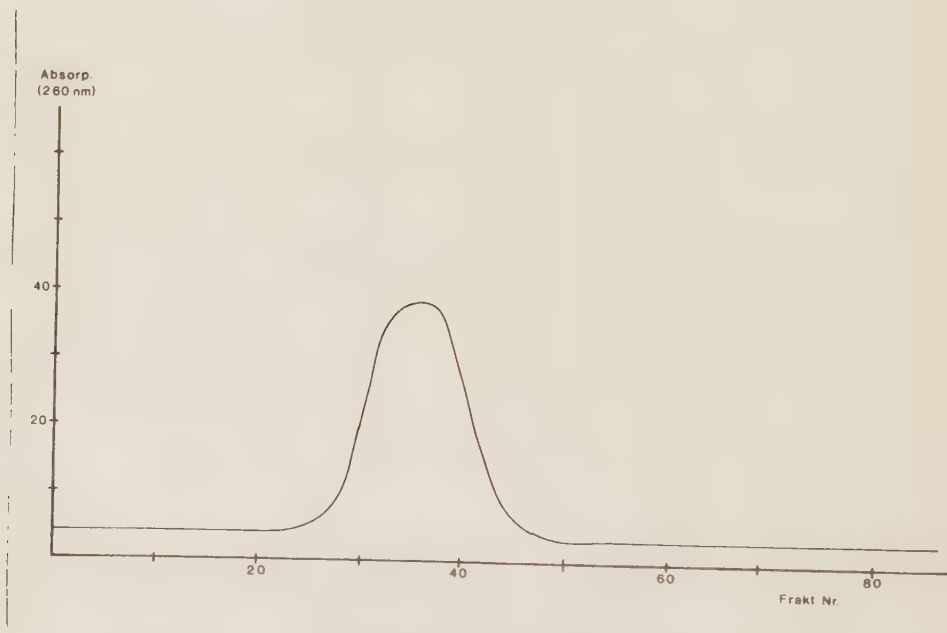


Abbildung 11: Rechromatographie der Fraktion "3" an CPG 10/250

Ionenaustauschchromatographie an CM- oder DEAE-Zellulose in die einzelnen Proteinuntereinheiten zerlegt werden. Meist wird das Protein nicht an das Trägermaterial gebunden. Gelingt eine Bindung, so läßt sich jedoch mit der Gradientenelution keine Fraktionierung erzielen.

4.4.5. Mengen sowie Zucker- und Hydroxyprolingehalt der Fraktionen

In allen Fraktionen lassen sich Hydroxyprolin und die Zucker Galaktose, Glukose, Mannose, Fucose, Sialinsäure und Glukosamin nachweisen (Tabelle 8 sowie 9 bis 12).

Fraktion "1" ist nur mit ca 10 % am Aufbau der Basalmembranen beteiligt (bezogen auf gelöste Basalmembranen (Tab. 8)), enthält aber mit 13,6 % den höchsten Zuckeranteil, der aus 2,5 % Galaktose, 5,1 % Glukose, 0,6 % Mannose, 1,0 % Fucose, 1,2 % Sialinsäure und 3,2 % Glukosamin besteht (Tab. 9). Ihr Hydroxyprolingehalt beträgt etwa 1 % (Tab. 8).

Circa 30 % der eingesetzten Basalmembran werden als Fraktion "2" gewonnen (Tab. 8). Die Kohlenhydrate setzen sich zusammen aus 1,0 % Galaktose, 3,8 % Glukose, 0,6 % Mannose, 0,7 % Fucose, 0,6 % Sialinsäure und 1,0 % Glukosamin (Tab. 10). Sie enthält 5,9 % Hydroxyprolin (Tab. 8).

Den größten Anteil an den Basalmembranen stellt mit ca 45 % Fraktion "3". Sie enthält mit 10,8 % das meiste Hydroxyprolin (Tab. 8) und mit 9,1 % den zweithöchsten Zuckergehalt (2,0 % Galaktose, 3,9 % Glukose, 0,8 % Mannose, 0,6 % Fucose, 0,4 % Sialinsäure und 1,5 % Glukosamin (Tab. 11)).

Der Zuckeranteil der Fraktion "4" beträgt 5,4 % und besteht aus 0,9 % Galaktose, 1,1 % Glukose, 0,6 % Mannose, 0,3 % Fucose, 0,3 % Sialinsäure und 2,2 % Glukosamin (Tab. 12). Sie enthält etwa 1 % Hydroxyprolin und ist mit ungefähr 15 % am Aufbau der Basalmembranen beteiligt (Tab. 8).

Frakt. Nr.	n	Menge (% der +) GBM)	n	Zuckergehalt (% des Prot.)	n	Hydroxyprolin (% des Prot.)	n	Radiomarkierung (% der GBM)
1	7	8,7 ± 2,8	5	7,0 ± 0,2	5	1,0 ± 0,3	8	16,9 ± 0,8
2	7	28,7 ± 5,6	5	3,8 ± 0,3	5	5,9 ± 1,0	8	26,5 ± 1,8
3	7	47,7 ± 4,4	5	4,8 ± 0,3	5	10,8 ± 1,7	8	45,5 ± 1,9
4	7	14,9 ± 2,9	5	2,1 ± 0,2	5	1,2 ± 0,5	8	11,2 ± 1,6

Tabelle 8: Menge der einzelnen Fraktionen, ihr Zucker- und Hydroxyprolingehalt sowie ihre Radiomarkierung. Der Zuckergehalt wurde mit der Anthronreaktion bestimmt.

+) bezogen auf gelöste Basalmembran (GBM)

	n	$\mu\text{g}/\text{mg}$	% des Prot.	% der Zucker	n	% der Radio- aktivität der Frakt.	% der Zucker- aktivität
GALAKTOSE	3	$25,2 \pm 0,3$	2,5	18,5	3	$0,8 \pm 0,1$	6,9
GLUKOSE	3	$51,4 \pm 0,8$	5,1	37,8	3	$1,1 \pm 0,3$	9,6
MANNOSE	3	$5,6 \pm 0,1$	0,6	4,1	3	$1,2 \pm 0,5$	10,3
FUCOSE	5	$10,4 \pm 0,7$	1,0	7,7	3	$3,6 \pm 0,7$	31,0
SIALINSÄURE	5	$11,9 \pm 1,9$	1,2	8,8	3	$3,6 \pm 0,3$	31,0
GLUKOSAMIN	3	$31,5 \pm 0,5$	3,2	23,2	3	$1,3 \pm 0,5$	11,2
		S: 136,0				S: 11,6	

- 61 -

Tabelle 9: Mengen- und Radioaktivitätsverteilung der einzelnen Zucker in
Fraktion Nr. 1

	n	µg/mg	% des Prot.	% der Zucker	n	% der Radio- aktivität der Frakt.	% der Zucker- aktivität
GALAKTOSE	3	10,2 ± 0,3	1,0	13,1	3	2,2 ± 0,7	9,2
GLUKOSE	3	37,9 ± 0,2	3,8	48,5	3	2,9 ± 0,2	12,1
MANNOSE	3	6,3 ± 0,1	0,6	8,1	3	2,2 ± 0,2	9,2
FUCOSE	5	7,4 ± 0,4	0,7	9,5	3	7,8 ± 0,2	32,7
SIALINSÄURE	5	6,4 ± 0,7	0,6	8,2	3	1,8 ± 0,1	7,5
GLUKOSAMIN	3	9,9 ± 0,4	1,0	12,6	3	7,0 ± 0,3	29,3

1 62 1

Tabelle 10: Mengen- und Radioaktivitätsverteilung der einzelnen Zucker
in Fraktion Nr. 2

	n	µg/mg	% des Prot.	% des Zucker	n	% der Radioaktivität der Frakt.	% der Zuckeraktivität
GALAKTOSE	3	19,8 ± 0,5	2,0	21,8	3	3,3 ± 0,1	10,2
GLUKOSE	3	38,5 ± 0,6	3,9	42,5	3	5,6 ± 0,2	17,3
MANNOSE	3	7,7 ± 0,4	0,8	8,5	3	2,6 ± 0,1	8,0
FUCOSE	5	5,7 ± 0,6	0,6	6,3	3	7,4 ± 0,1	22,8
SIALINSÄURE	5	4,4 ± 0,3	0,4	4,9	3	2,0 ± 0,1	6,2
GLUKOSAMIN	3	14,6 ± 0,2	1,5	16,0	3	11,5 ± 0,1	35,5

S: 90,7

S: 32,4

Tabelle 11: Mengen- und Radioaktivitätsverteilung der Zucker in Fraktion Nr. 3

	n	µg/mg	% des Prot.	% der Zucker	n	% der Radio- aktivität der Frakt.	% der Zucker- aktivität
GALAKTOSE	3	8,6 ± 0,1	0,9	16,0	3	2,7 ± 0,3	3,9
GLUKOSE	3	11,2 ± 1,3	1,1	20,9	3	6,6 ± 0,4	9,6
MANNOSE	3	5,7 ± 0,2	0,6	10,6	3	3,7 ± 0,3	5,4
FUCOSE	5	2,9 ± 0,9	0,3	5,4	3	13,6 ± 0,5	19,7
SIALINSÄURE	5	3,1 ± 0,3	0,3	5,8	3	1,8 ± 0,5	2,6
GLUKOSAMIN	3	22,3 ± 0,3	2,2	41,3	3	40,7 ± 1,2	58,8
	S: 53,8				S: 69,1		

1
64
1

Tabelle 12: Mengen- und Radioaktivitätsverteilung der Zucker in
Fraktion Nr. 4

4.4.6. Radiomarkierung der Fraktionen

Nach Inkubation der Glomeruli mit $[U-^{14}C]$ -Glukose sind die einzelnen Fraktionen der anschließend gewonnenen Basalmembranen alle markiert. Die Verteilung der Radioaktivität folgt ungefähr der Mengenverteilung. So enthält Fraktion "1" 17 %, Fraktion "2" 27 %, Fraktion "3" 46 % und Fraktion "4" 11 % (Tab. 8) der Basalmembranaktivität. Unterschiedlich ist die Radiomarkierung der Zuckeranteile sowie der einzelnen Zucker in den Fraktionen (Tab. 8 - 12).

In Fraktion "1" entfallen 12 % der aufgenommenen Aktivität auf die Zucker, von denen Fucose und Sialinsäure mit je 31 % der Zuckeraktivität am höchsten markiert sind (Tab. 9).

In Fraktion "2" enthält der Kohlenhydratanteil 24 % der Aktivität. Die höchste Radioaktivität zeigen Fucose und Glukosamin mit 33 bzw. 29 % der Zuckeraktivität (Tab. 10).

Die Markierung der Zucker in Fraktion "3" beträgt 32 % der insgesamt aufgenommenen Aktivität. Auch hier sind Glukosamin und Fucose mit 36 bzw. 23 % der Zuckeraktivität am höchsten markiert (Tab. 11).

In Fraktion "4" entfallen 69 % der Gesamtaktivität auf die Zuckerkomponente, wobei Glukosamin alleine 59 % der Zuckeraktivität enthält (Tab. 12).

5. Diskussion

5.1. Präparation und Stoffwechselaktivität der Glomeruli

Die Basalmembranen werden am besten von isolierten Glomeruli gewonnen. Daher muß man zuerst Glomeruli in möglichst reiner und intakter Form, aber auch in ausreichenden Mengen, aus dem Nierencortex präparieren. Die in der Literatur beschriebenen Methoden liefern jedoch nur teilweise befriedigende Ergebnisse. Sei es, daß sie sehr zeitraubend sind (Cook und Pickering 1958, Nagano und Schäfer 1963, Misra und Berman 1966), sei es, daß sie nur geringe Ausbeuten ergeben und die Präparationen zusätzlich mehr oder weniger stark verunreinigt sind (Solomon et al 1949, Törnblom 1957, Dubach und Recant 1960, Richterich und Franz 1960, Fong und Drummond 1968, Gang 1970 b).

Als beste Präparationstechnik, die deshalb auch hier angewendet wird, erweist sich das von Krakower und Greenspon (1951) entwickelte und inzwischen mehrfach modifizierte Verfahren (Spiro 1967 a, Skoglund 1970, Vancura et al 1970, Misra 1972). Hierbei wird, um die Glomeruli freizusetzen, zerkleinerter Nierencortex unter leichtem Druck und unter ständiger Spülung mit physiologischen Medien durch ein Sieb definierter Maschenweite gepreßt. Aus dem Gewebebrei kann man dann die Glomeruli durch Siebung isolieren, wobei gleichzeitig größere und kleinere Gewebestücke einschließlich der Tubuli abgetrennt werden. Die Maschenweite der Siebe, sowohl beim Filtrationsprozeß als auch bei der Zerkleinerung des Cortex, muß je nach Spezies und dem Alter der Tiere variiert werden.

Mit diesem Siebverfahren erhält man eine relativ große Menge an praktisch tubulifreien Glomeruli, die sich als noch funktionsfähiges Zellsystem erweisen, obwohl morphologisch nachweisbar bei der Präparation einige Zellen, vor allem die Podocyten, geschädigt werden (Buss et al 1971, Gregoire 1975). Sie sind, auch bei Mehrfachbestimmungen und in guter Reproduzierbarkeit, über lange Zeit stoffwechselaktiv, wie die Veratmung verschiedener Substrate zu CO_2 und die Messung ihres Sauerstoffverbrauchs beweisen (Nowinski

und Pigon 1967, Walker 1967, Fong und Drummond 1968, 1969, Wahl et al 1970, Brendel und Meezan 1973, Lamberts et al 1973, 1974, Gregoire 1975). Der bei ihrer Isolierung eintretende Verlust an zytoplasmatischen Enzymen (Richterich und Franz 1961, Gregoire 1975) mag sich in einer verminderten Umsatzrate einiger Substrate bemerkbar machen. Die so gewonnenen Glomeruli lassen sich auch zur Anlage einer Gewebekultur verwenden (Bernik 1969, Quadracci und Striker 1970, Fish et al 1972, 1975, Burlington und Cronkite 1973, Scheinman et al 1974).

5.2. Gewinnung der Basalmembranen

Um die Basalmembranen zu erhalten, muß man den glomerulären Zellverband zerstören. Dabei sollten gleichzeitig die Zellreste, die relativ fest an die Membran gebunden sein können, abgelöst werden. Von den beschriebenen Methoden sind die mechanischen Verfahren, die Glomeruli durch Ultraschall (Spiro 1967 a) oder durch Homogenisation (v. Bruchhausen und Merker 1965 a) zu zerstören, den anderen vorzuziehen, da bei Anwendung von proteolytischen Enzymen (Sharp et al 1967) oder von Chemikalien, wie Säuren (Greenspon et al 1952) und Basen (Lazarow und Speidel 1964), die Membran selbst angegriffen wird. Wie der hohe Hydroxyprolingehalt (ca 4 %) im Überstand von Basalmembranen zeigt, die durch Homogenisation gewonnen aber nachträglich beschallt wurden, werden sie jedoch auch bei Einwirkung von Ultraschall teilweise zerstört, so daß bei ihrer Trennung von den übrigen glomerulären Bestandteilen durch Zentrifugation Membrananteile verloren gehen. Damit hängt aber die weitgehende Erhaltung des Originalzustandes der Basalmembranfraktion sowie ihre Reinheit wesentlich von der Präparationsmethode ab.

Obwohl bei der Isolierung gleiche Glomerulimengen eingesetzt werden, differieren die Ausbeuten an Basalmembranen sehr. Dies kann durchaus methodisch bedingt sein. Zu berücksichtigen ist aber auch, daß die Nieren nicht von einheitlichen Versuchstieren stammen, sondern von Schlachthausmaterial, dessen Herkunft und Alter nicht bekannt sind. So liegen sicherlich die Unterschiede

in den Ausbeuten auch am verschiedenen Basalmembrangehalt der Glomeruli, der bekanntlich vom Alter der Tiere abhängt (Bloom et al 1959, Ashworth et al 1960, Guttman und Kohn 1960, Chiquoine 1961, Wolff 1962, Rosenquist und Bernick 1971, Regnault und Kern 1974).

5.3. Reinheit der Basalmembranen

Für die Reinheit der Basalmembranpräparation gibt es keine meßbaren Kriterien. Sie muß deshalb morphologisch überprüft werden. Außerdem kann man, da Basalmembranen als extrazelluläre Strukturen keine Nukleinsäuren enthalten sollten, von ihrem DNA- und RNA-Gehalt auf eine Verunreinigung durch zelluläre Bestandteile schließen.

Nach den licht- und elektronenoptischen Untersuchungen (v. Bruchhausen 1969) besteht die durch Homogenisation und Gradientenzentrifugation gewonnene Präparation mindestens zu 95 % aus Basalmembranen, und zwar aus glomerulären. Sie können keine nennenswerten Anteile an tubulären Basalmembranen enthalten, da bei ihrer Isolierung eine nahezu tubulifreie Glomerulifraktion eingesetzt wird. Auch kann man wegen des geringen DNA- und RNA-Gehalts ($< 1\%$) eine größere Verunreinigung durch zelluläre Partikel ausschließen. Vergleicht man die durch Homogenisation mit den durch Ultraschall präparierten Membranen, so unterscheiden sie sich nach den Angaben von Spiro (1967 a) weder im Hydroxyprolinegehalt (6,5 %), noch im mit der Anthronreaktion bestimmten Neutralzuckergehalt (5,2 %).

Bei histochemischen Untersuchungen des Glomerulus läßt sich Sialinsäure in den Basalmembranen nicht darstellen, obwohl sie in allen Präparationen bestimmt wird, die Werte streuen allerdings sehr (von 0,5 bis 2,5 %). Es werden lediglich reaktionspositive Ablagerungen an den äußeren Rändern der Lamina rara interna und externa gefunden (Rambourg und Leblond 1967, Skoza und Mohos 1968, Gronowski et al 1969, Jones 1969, Mohos und Skoza 1969, 1970, Fowler 1970, Geyer et al 1970). Deshalb vermuten Mohos und Skoza, daß die Neuraminsäure durch Zellmembranen in den Präparationen nur vorgetäuscht wird und daher auch ein Maß für die Verunreini-

gung ist. Ihre Präparationen an Rinderbasalmembranen, die sie mit Ultraschall gewinnen, enthalten eine von der Zentrifugalkraft der Sedimentation abhängige Sialinsäurekonzentration. Sie nehmen daher an, daß bei Zentrifugation mit geringer Drehzahl die Zellmembranen überwiegend im Überstand verbleiben und damit eine reinere Präparation zu erzielen ist. Als optimal erreichbaren Wert geben sie einen Gehalt an Neuraminsäure von ca 1,2 % an.

Die glomerulären Basalmembranen des Rindes, die nach der Methode von v. Bruchhausen und Merker isoliert wird, enthält einen deutlichen, wenn auch mit 0,54 % geringen Anteil an Sialinsäure (Tab. 5). Dies spricht nach den Daten von Mohos und Skoza für eine sehr geringe Verunreinigung. Sollte der Sialinsäuregehalt aber tatsächlich durch Zellmembranen verursacht werden, so müßte eine zusätzliche Beschallung dieser Basalmembranpräparation und ihre anschließende Sedimentierung mit geringer Zentrifugalkraft zu einer Reinigung führen, die sich in einer weiteren Abnahme des Sialinsäuregehalts bemerkbar machen sollte.

Dies ist aber nicht der Fall. Zwar wird ein beträchtlicher Teil der Basalmembranen zerstört, wie aus dem Hydroxyprolinegehalt des Überstands zu ersehen ist, die Sialinsäurekonzentration im Sediment jedoch bleibt konstant. Isoliert man nachträglich aus der durch Homogenisation gewonnenen Basalmembran auf chemischem Wege mit 60 prozentiger Trichloressigsäure die Lamina densa (Greenspon et al 1952), so zeigt auch sie eine mit dem Ausgangsmaterial identische Kohlenhydratzusammensetzung. Nicholes und Mitarbeiter (1973) finden dagegen bei mit Ultraschall isolierten Basalmembranen eine Abnahme sowohl des Sialinsäure- als auch des Mannosegehalts (um 60 bzw. 75 %) (Tab. 13 Nr. 16).

Die Neuraminsäure kann histologisch auch in isolierten Basalmembranen nicht nachgewiesen werden, obwohl ihr Gehalt in den Membranen nach Westberg und Michael (1970) größer als im Gesamtglomerulus ist. Das kann aber nur bedeuten, daß die Sialinsäure durch ihre besondere Bindung in der Zuckerkomponente der histochemischen Reaktion nicht zugänglich ist.

Das Verfahren von v. Bruchhausen und Merker liefert gleichbleibende Basalmembranpräparationen, wie sich bei ihrer gelelektrophoretischen Auftrennung zeigt. Sie ergeben immer die gleichen Trennmuster (Abb. 7), während diese bei den mit Ultraschall isolierten Membranen differieren, und zwar abhängig von Dauer und Intensität der Beschallung (Myers und Bartlett 1972).

Nach all den Untersuchungen lassen sich demnach durch Homogenisation und Gradientenzentrifugation glomeruläre Basalmembranen isolieren, die, wenn nicht sogar geringfügiger verunreinigt, so doch mindestens ebenso rein sind wie die durch Ultraschall gewonnenen, aber bei der Präparation weitgehend ihren Originalzustand beibehalten.

5.4. Verwendung der radioaktiven Vorstufen zur Biosynthese der Basalmembranen

Nach Inkubation der isolierten nach stoffwechselaktiven Glomeruli mit verschiedenen radioaktiven Substanzen sind die anschließend gewonnenen Basalmembranen deutlich markiert. Die Radioaktivität könnte allerdings durch Adsorption der Precursoren oder deren Stoffwechselprodukte nur vorgetäuscht sein. Dies ist aber nach den vielen Waschvorgängen bei der Gewinnung unwahrscheinlich und durch die Markierung isolierter Basalmembranekomponenten, wie zum Beispiel der Lipide, eindeutig auszuschließen. Auch zeigt der Zeitverlauf der Radioaktivitätsaufnahme (Abb. 4) keine Ähnlichkeit mit Adsorptionsisothermen.

Da die Glomeruli bei ihrer Isolierung mehr oder weniger geschädigt und außerdem nicht von einheitlichem biologischen Material gewonnen werden, sind sie unterschiedlich stoffwechselaktiv und dementsprechend variiert die Markierung der Basalmembranen von Präparation zu Präparation (zum Beispiel: nach Inkubation mit Glukose zwischen 800 und 2000 dpm/mg GBM). Um verschiedenen Präparationen miteinander vergleichen zu können, wird deshalb die Radiomarkierung einzelner Bestandteile als Prozentsatz der insgesamt von den Basalmembranen aufgenommenen Radioaktivität angegeben. Zur Betrachtung der Umsatzraten lassen sich aber die

spezifischen Aktivitäten heranziehen, die jeweils aus den Ergebnissen eines Experiments berechnet sind.

Inkubiert man die Glomeruli mit $[U-^{14}C]$ -Acetat oder $[U-^{14}C]$ -Glycerin, so wird die von den Basalmembranen aufgenommene Radioaktivität hauptsächlich in ihren Lipiden gefunden (60 bzw. 70 %). Die Verwendung dieser beiden Substanzen zur Synthese anderer Basalmembranbestandteile wurde nicht untersucht. Nach Angebot von $[U-^{14}C]$ -Glukose enthalten ihre Lipide ca 20 %, ihre Kohlenhydrate ca 30 % und die Proteinkomponente ca 50 % der Basalmembranradioaktivität. Die Glukose wird also zum beträchtlichen Teil, wie auch in anderen Fällen (Spiro und Spiro 1966), zu Aminosäuren umgewandelt und zur Proteinsynthese verwendet.

Damit eignen sich, wie schon v. Bruchhausen (1971) vermutete, isolierte noch stoffwechselaktive Glomeruli zu biochemischen Untersuchungen von Basalmembranen. Sie synthetisieren innerhalb der Inkubationszeit von zwei Stunden aus der Glukose unter Verwendung von Glykolysezwischenprodukten andere niedermolekulare Substanzen, die dann gezielt zum Aufbau makromolekularer Bestandteile der Basalmembranen eingesetzt werden. Basalmembranen werden demnach regeneriert und gehören nicht, wie angenommen (Pierce 1970, Taylor et al 1971), zu den permanenten Strukturen, die über keine oder nur sehr geringe biologische Erneuerung verfügen. Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente bestätigen die Markierungsversuche, die vor allem mit radioaktiven Aminosäuren sowohl für die glomeruläre Basalmembran in vivo (Lazarow und Speidel 1964, Chow und Drummond 1969, Blau und Michael 1971, Romen et al 1976) und in vitro (Wahl et al 1970, v. Bruchhausen 1971, Cohen und Vogt 1972, 1975, Grant und Harwood 1974, Grant et al 1975, Beisswenger 1976, Williams et al 1976) als auch für andere Basalmembranen unternommen wurden (Grant et al 1972, 1973, Clark et al 1973, 1975, 1976, Kefalides et al 1976, Minor et al 1976). Zur Untersuchung der Biosynthese glomerulärer Basalmembranen lassen sich die Daten von Krisko und Mitarbeitern (Krisko und Gyorkey 1974, Krisko und Walker 1974) nicht heranziehen, da sie die Einbauraten verschiedener radioaktiver Precursoren lediglich im Gesamtglomerulus bestimmten, nicht aber in isolierten Basalmembranen.

Die Bestandteile der extrazellulären Basalmembranen können nur von den unmittelbar angrenzenden Zellen synthetisiert werden. Nach den morphologischen Untersuchungen (Kurtz 1958, Farquhar et al 1961, Vernier und Birch-Andersen 1962, Walker 1970, 1972, 1973) liefern wahrscheinlich im Glomerulus sowohl Endothel- als auch die Epithelzellen Anteile zur Basalmembran, wobei aber nicht auszuschließen ist, daß die verschiedenen Zellarten nur bestimmte Membranbestandteile synthetisieren. Eine Aussage dazu ist jedoch durch die Markierungsversuche nicht möglich.

5.5. Zuckergehalt der Basalmembranen

In den glomerulären Basalmembranen des Rindes lassen sich immer die Zucker Glukose, Galaktose, Mannose, Fucose, Glukosamin und Sialinsäure nachweisen. Sie sind kovalent an Proteine gebunden und somit Bestandteil von Glykoproteinen (zur Definition von Glykoproteinen: Gottschalk 1966). Da weder Uronsäuren noch Sulfat in den Präparationen gefunden wird, enthalten sie keine Glukosaminoglykane. In Tabelle 13 sind die prozentualen Anteile der einzelnen Zucker an der Zusammensetzung renaler glomerulärer Basalmembranen verschiedener Spezies gegenübergestellt. Die in dieser Arbeit ermittelten Werte (Tab. 13, Nr. 1) stimmen gut mit den Daten anderer Autoren überein. Die Differenzen, die auch bei Gruppen anderer Tierarten auftreten, obwohl hier die Basalmembran durch identische Präparationstechniken gewonnen wurden, dürften durch unterschiedliche Analysenmethoden und die Schwierigkeiten der Bestimmung von Zuckern in Glykoproteinen verursacht werden.

Die Zucker müssen vor ihrer Trennung -bei der säulenchromatographische Verfahren gegenüber den anderen Methoden gewisse Vorteile haben, da im Eluat sowohl die Menge als auch die Radioaktivität nebeneinander bestimmt werden können -hydrolytisch freigesetzt werden. Da die glykosidischen Bindungen innerhalb der Polysaccharidketten und zum Proteincore unterschiedlich resistent sind, muß man die optimalen Bedingungen der Hydrolyse für jeden einzelnen Zucker experimentell ermitteln (Marshall und Neuberger 1972). Außerdem werden die Kohlenhydrate bei Säureeinwirkung teilweise

Nr	Spezie	Präp	Glu	Gal	Man	Fuc	Sial	Gluc-A	Gal-A
1	Ri	H	2,55	2,59	0,77	0,62	0,54	1,34	---
2	Ri	S	2,47	3,05	0,77	0,22	1,00	1,37	0,20
3	Ri	S	2,58	3,34	0,83	0,14	0,57	1,65	
4	Ri	S	2,42	3,13	0,79	0,13	0,59	1,25	
5	Ra	S	1,90	1,88	2,72	0,63	0,77	1,33	0,75
6	Ra	S	1,60	3,00	1,20	0,40	0,80	2,60	
7	Ra	S	1,87	2,34	0,57	0,14	0,47	1,42	---
8	Me	S	2,78	3,00	0,57	0,23	0,71	0,91	---
9	Me	S	2,50	2,90	1,10	0,50	1,05	1,20	0,30
10	Me	S	2,03	2,33	0,55	0,14	0,61	0,88	0,12
11	Me	S	2,50	2,60	1,70	0,70	1,50	1,70	0,30
12	Me	S	1,80	2,90	0,90	0,60	0,60	2,00	
13	Hu	S	1,90	2,20	1,41	0,75	2,10	1,40	---
14	Hu	S	2,40	2,50	2,10	0,75	2,00	1,20	0,30
15	Hu	S	2,20	2,10	2,00	0,70	1,10	1,40	
	Hu	S	2,31	2,80	1,04	0,58	1,03	1,93	---
16	Hu	Tca	3,82	2,47	0,76	0,60	0,60	1,35	---

Tabelle 13: Gegenüberstellung der Zuckeranteile (in %) glomerulärer Basalmembranen verschiedener Spezies

Abk.: Ri: Rind, Ra: Ratte, Me: Mensch, Hu: Hund,
 Präp: Präparationsmethode, H: Homogenisation
 und Gradientenzentrifugation, S: Schall,
 Tca: Trichloressigsäure.

Literatur: 1: diese Arbeit, 2: Spiro 1967,
 3: 4: Hudson und Spiro 1972, 5: Wahl et al
 1970, 6: Misra 1973, 7: Lui und Kalant
 1974, 8: Westberg und Michael 1970,
 9: Mahieu und Winand 1970, 10: Beisswenger
 und Spiro 1973, 11: Kefalides 1970, 12:
 Misra 1973, 13: Kefalides und Winzler 1966,
 14: Kefalides und Denduchis 1969, 15: Misra
 1973, 16: Nicholes et al 1973

zersetzt und gehen mit Aminosäuren Nebenreaktionen ein.

5.6. Biosynthese der Basalmembranzucker aus angebotener Glukose

Inkubiert man die isolierten Glomeruli mit $[U-^{14}C]$ -Glukose, so sind in den anschließend gewonnenen Basalmembranen alle Zucker radiomarkiert (Tab. 6). Die Zellen der Glomeruli synthetisieren daher aus der angebotenen Glukose innerhalb von zwei Stunden andere Kohlenhydrate und verwenden diese bei der Biosynthese der extrazellulär gelegenen Basalmembranen.

Den Zeitverlauf der Radiomarkierung einzelner Basalmembranzucker und damit ihre Bildungsraten kann man mit den hier durchgeführten Experimenten nicht erfassen. Bei einer kürzeren Inkubation als zwei Stunden läßt sich, obwohl die Basalmembranen markiert sind (Abb. 4), die Radioaktivität in den isolierten Monosacchariden nicht eindeutig bestimmen, da sie zu gering ist. Inkubiert man länger, so ergibt sich keine andere Verteilung. Zu berücksichtigen ist hierbei aber, daß bei der Biosynthese zwei zeitabhängige Vorgänge ablaufen müssen. Erstens erfolgt eine Umwandlung der Glukose in die anderen Zucker, und zweitens müssen die Basalmembran Komponenten aus den synthetisierenden Zellen transportiert werden. Daneben wird der größte Teil der Glukose zur Aufrechterhaltung des Energiestoffwechsels und zur Synthese weiterer glomerulärer Bestandteile verbraucht.

In Abbildung 12 sind die nach unseren heutigen Kenntnissen allgemein gültigen Stoffwechselwege der gegenseitigen Umwandlung von Zuckermolekülen durch Epimerisierung, Acetylierung, Aminierung und Kettenverlängerung schematisch dargestellt (Hough und Jones 1956, Roseman 1959, Hollmann 1961, Neufeld und Hassid 1963, Caputto et al 1967, Winzler und Bekesi 1967, Herman 1971, Spiro 1971). Sie zeigt auch die Bildung der Nukleotide, die die eigentlichen Vorstufen bei der Biosynthese zuckerhaltiger Makromoleküle sind (Leloir et al 1960, Strominger 1960, Dedonder 1961, Neufeld und Hassid 1963, Ginsburg 1964, Leloir 1964, Pridham 1965, Ginsburg und Neufeld 1969, Nikaido und Hassid 1971). Die Umwandlungswege der Glukose in andere Kohlenhydrate können nicht über

eine Analyse der Zuckernukleotide bestimmt werden. Ihre Konzentration muß in den glomerulären Zellen sehr gering sein, da sich nach eigenen Versuchen selbst aus 20 g Glomeruli keine meßbaren Mengen isolieren lassen. Die Zuckernukleotide werden demnach nicht akkumuliert, sondern sofort nach ihrer Bildung weiter umgesetzt. Somit dürfte auch hier, wie in den meisten Fällen, ihre Biosynthese durch feedback-Mechanismen geregelt werden (Neufeld und Ginsburg 1965, Nikaido und Hassid 1971). Daher bestimmen im Wesentlichen die Umsatzraten zuckerhaltiger glomerulärer Bestandteile, für deren Synthese die Zuckernukleotide verbraucht werden, ihre Bildung und damit aber auch indirekt die Verstoffwechslung der Glukose zu anderen Kohlenhydraten.

Wie die gelelektrophoretischen und gelchromatographischen Auftrennungen zeigen (Abb. 8 und 9), sind die Basalmembranen selbst kein einheitliches Protein, sondern ein Komplex aus mehreren Polypeptiden, die alle Zucker enthalten (Tab. 8). Da die Zuckeranteile der einzelnen Basalmembranfraktionen verschieden markiert und diese demnach unterschiedlich schnell regeneriert werden (Tab. 8), bestimmen somit auch sie die Umwandlung der Glukose in andere Kohlenhydrate.

Soweit die Biosynthese von Glykoproteinen bekannt ist, beginnt die Bildung ihrer Zuckeranteile erst, nachdem die Synthese der Proteinkomponente abgeschlossen ist (Marshall und Neuberger 1970, Spiro 1970, 1973, Heath 1971, Marshall 1972). Sie wird kurz nach der Translation eingeleitet, indem eine oder mehrere der Aminosäuren, die als Akzeptor fungieren können, glykosyliert werden. Bestimmend für diesen ersten Schritt ist ihre Position in der Aminosäurekette und damit deren Sequenz (Marshall 1974). Beim Transport des Proteins durch das Zisternensystem des endoplasmatischen Retikulums und im Golgi-Apparat wird das Oligosaccharid aufgebaut. Dabei übertragen Transferasen, deren Spezifität die Struktur der Saccharidkette festlegen, schrittweise von den aktivierten Zuckern, den Zuckernukleotiden, die Zucker auf den oder die schon gebundenen.

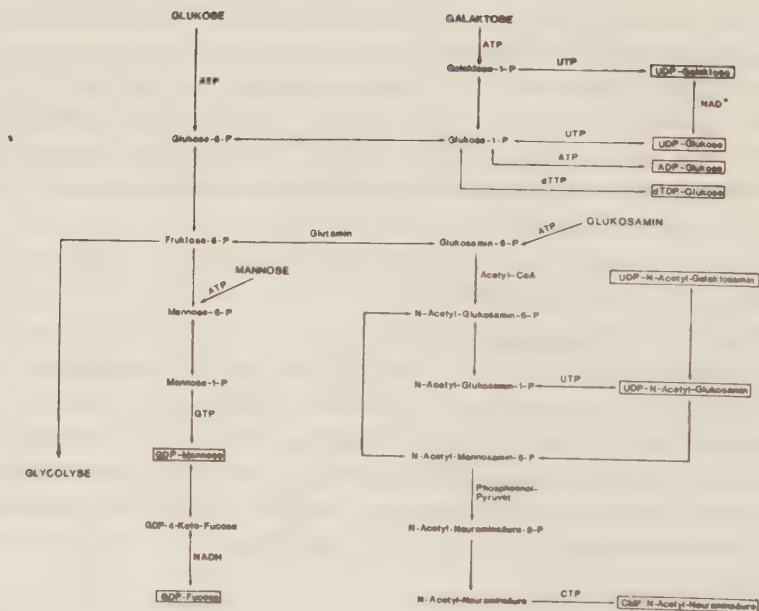


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Umwandlungswege von Zuckern sowie die Bildung von Zuckernukleotiden

Nach den vielen bisher untersuchten Glykoproteinen der unterschiedlichsten Art und Herkunft sind ihre Saccharideinheiten vorwiegend mit dem Protein durch Bindungen zwischen den Aminosäuren Asparagin, Hydroxylysin, Serin und Threonin einerseits und den Zuckern Glukosamin, Galaktosamin, Galaktose und Mannose andererseits verknüpft (Gottschalk 1963, Spiro 1963, 1969, Neuberger et al 1966, Kent 1967, Marshall und Neuberger 1970, Schmid 1972, Marshall 1974, Kornfeld und Kornfeld 1976). Dabei können sowohl Serin als auch Threonin Galaktosamin, Galaktose oder Mannose binden, Asparagin aber nur Glukosamin und Hydroxylysin nur Galaktose. In den glomerulären Basalmembranen des Rindes existieren zwei dieser Bindungsarten. Einmal kann man ein Disaccharid aus Galaktose und Glukose isolieren, das O-glykosidisch über die Galaktose mit Hydroxylysin verknüpft ist. Zum anderen lassen sich Polysaccharide nachweisen, die über Glukosamin durch eine Amidbindung an Asparagin gebunden sind (Spiro 1967 b, c).

Beim Umsatz der Basalmembranen, der nur ein kontinuierlicher Prozeß sein kann, müssen die Zellen, die an der Basalmembranbildung beteiligt sind, in dem Maße neues Material liefern, wie es abgebaut wird. Wie schon erwähnt, sind die Synthese der Peptide und ihre Glykosylierung sowie die Hydroxylierung von Prolin und Lysin, die erst erfolgt, nachdem sie in die Polypeptidkette eingebaut wurden (Gould 1968, Rosenbloom und Prockop 1969, Prockop 1970), zeitabhängige Vorgänge; ebenso ihre Sekretion und extrazelluläre Zusammenfügung zur biologischen Struktur der Basalmembran. Das zeigt sich auch in der differenzierten Verwendung von Aminosäuren bei ihrer Synthese. Inkubiert man Glomeruli mit radioaktiven Aminosäuren (Glycin, Leucin, Lysin, Prolin), so sind die Basalmembranen bereits nach fünfzehn Minuten markiert (v. Bruchhausen 1971). In den für sie charakteristischen Aminosäuren Hydroxylysin und Hydroxyprolin läßt sich aber frühestens nach ein bis eineinhalb Stunden eindeutig Radioaktivität nachweisen (Cohen und Vogt 1972, 1975, Grant und Harwood 1974, Grant et al 1975, Williams et al 1976). Dies gilt auch für nicht glomeruläre

Basalmembranen (Grant et al 1972 a, Kefalides 1973, Kefalides et al 1976).

Man kann daher vermuten, daß in den Zellen Vorräte an mehr oder weniger fertigen Basalmembranpeptiden vorliegen. Dafür spricht, daß man aus Glomeruli bei Inkubation mit ^{14}C -Lysin und ^{14}C -Prolin nach etwa einer Stunde radioaktive Proteine isolieren kann, die nach dem Verhältnis ihres Prolin- zu Hydroxyprolingehalts und dem Anteil an glykosyliertem Hydroxylysin nur Basalmembranbestandteil sein können (Cohen und Vogt 1972, 1975, Grant und Harwood 1974, Grant et al 1975, Williams et al 1976). Bei Stoßmarkierungsexperimenten, d.h. bei Inkorporation von radioaktivem Prolin über zwei Stunden und anschließend von unmarkiertem Prolin über weitere vier Stunden, ist die Radioaktivität fast ausschließlich in den extrazellulären Basalmembranen zu finden (Williams et al 1976).

Es liegt daher nahe, daß die angebotene Glukose bevorzugt in solche Zucker umgewandelt wird, die zur Vollendung der Saccharidanteile bereits vorliegender Basalmembranpeptide benötigt werden. Darauf weist auch die geringe Beeinflussung der Glukoseverwertung durch Hemmstoffe der Proteinsynthese hin (v. Bruchhausen 1971). Allerdings ist nicht auszuschließen, daß bei diesen Experimenten die Zucker der anschließend gewonnenen Basalmembranen anders radiomarkiert sind. Damit erklärt sich aber auch die sehr hohe spezifische Aktivität der Fucose und die relativ hohe der Sialinsäure (Abb. 6), die in den Oligosacchariden der Glykoproteine hauptsächlich am Ende der Ketten stehen und bevorzugt angehängt werden, wenn das Protein das endoplasmatische Retikulum verlassen hat und in den Golgi-Apparat eingedrungen ist (Schachter 1974). Der Golgi-Apparat hat unter anderem die wichtige Funktion, Substanzen, die die Zelle verlassen, zu sammeln und zur Ausschleusung vorzubereiten (Whaley 1975).

Die angebotene Glukose wird aber auch zum beträchtlichen Teil nach ihrer Umwandlung in Aminosäuren zum Aufbau von Basalmembranproteinen verwendet, die danach ca 50 % der insgesamt aufgenommenen

Radioaktivität enthalten. Somit erfolgt innerhalb der Inkubationsperiode von zwei Stunden, und wie die Untersuchungen von v. Bruchhausen (1971) bestätigen, eine Totalsynthese, wenn auch nicht von allen, so doch von gewissen Proteinanteilen der Basalmembranen. Da die Peptide, die Hydroxylysin und damit Disaccharide enthalten, relativ langsam umgesetzt werden, müssen folglich diejenigen mit den Heteropolysaachariden schneller regeneriert werden. Damit erklärt sich dann aber auch die hohe spezifische Aktivität des Glukosamins (Abb. 6). Bedingt durch die unterschiedlichen Umsatzraten muß die Glukose zum großen Teil in Glukosamin verstoffwechselt werden, das Proteincore und Zuckerkomponente miteinander verknüpft, denn erst nach seiner Bindung kann ein Aufbau der Saccharidkette erfolgen.

5.7. Lipide der Basalmembran

In den durch Homogenisation und Gradientenzentrifugation gewonnenen Präparationen werden 4,5 % Lipide gefunden. Da dieses Verfahren Basalmembranen liefert, die wie oben ausgeführt, weitgehend ihrem ursprünglichen Zustand entsprechen und nur geringfügig verunreinigt sind, ist es unwahrscheinlich, daß die Lipide Verunreinigungen sind, wie manche Autoren vermuten (Kefalides und Winzler 1966, Hempel und Geyer 1967, Spiro 1967 a, Westberg und Michael 1970, Nicholes et al 1973). Daß diese Autoren nur geringe Lipidmengen (um 1 %) in ihren Präparationen finden, ist durchaus verständlich, da eine zusätzliche Beschallung der durch Homogenisation gewonnenen Membranen ihren Lipidgehalt um ungefähr 85 % auf etwa 1,9 % reduziert. Im Gegensatz dazu verbleiben in der nachträglich isolierten Lamina densa noch circa 80 % der ursprünglich vorhandenen Lipide.

Auf Lipide als integralen Bestandteil der Basalmembranen weisen außerdem histochemische und polarisationsoptische Untersuchungen hin (Niessing und Rollhäuser 1954, Missmahl 1957, Glöckner et al 1974). Anscheinend ist aber ihr Gehalt im Gegensatz zur Aminosäure- und Kohlenhydratzusammensetzung speziesabhängig, denn die glomeruläre Basalmembran der Ratte enthält ca 10 % Lipide (v. Bruchhausen und

Merker 1965 a, Bongartz 1976). Daher können dann auch andere Arbeitsgruppen in glomerulären Basalmembranen des Menschen und der Ratte Lipide, da sie teilweise gegen eine Ultraschallextraktion resistent sind, in solchen Mengen nachweisen, die sich nicht mehr als Verunreinigungen deuten lassen (Dische et al 1965, Misra und Berman 1966, Gang und Kalant 1970, Wahl und Deppermann 1970, Fung und Kalant 1972, Sternberg und Kalant 1973, Sato et al 1975).

Dafür, daß Lipide Bestandteil der Membranen sind, sprechen außer der Konstanz des Fettgehalts von Präparation zu Präparation auch die unterschiedliche Verteilung einzelner Lipidklassen in den Lipiden der Basalmembranen und der glomerulären Zellfraktion. So betragen z.B. die Phosphatide in den Basalmembranlipiden 46,2 %, in denen der glomerulären Zellfraktion aber 54,0 %. Bei starken Verunreinigungen der Präparationen mit zellulären Bestandteilen müßte aber die Mengenverteilung der einzelnen Lipidkomponenten gleich sein oder nicht reproduzierbaren Schwankungen unterliegen.

5.8. Biosynthese der Lipide

Die Eigenständigkeit zeigt sich vor allem aber in der unterschiedlichen Radioaktivitätsaufnahme der Lipide glomerulärer Bestandteile nach Inkubation der Glomeruli mit $[U-^{14}C]$ -Glukose. Die spezifische Aktivität der Lipide der Basalmembranen, die weder von den Lipiden der mikrosomalen noch von denen der mitochondrialen Subfraktion erreicht wird (Kibel 1975), ist dreimal so hoch wie die des Fettanteils der glomerulären Zellfraktion (Tab. 3). Das kann aber nur bedeuten, daß jede eigenständige Lipidkomponente, abhängig von der subzellulären Struktur mit der sie assoziiert ist, eine für sie charakteristische Umsatzrate besitzt, oder daß bei ihrer Ausschleusung Verzögerungen auftreten, die unterschiedliche Umsatzraten vortäuschen.

Im Einklang dazu stehen die Befunde bei Inkorporation von $[U-^{14}C]$ -Acetat und $[U-^{14}C]$ -Glycerin. Hier erreichen nach zwei Stunden die

Basalmembranlipide nur etwa ein Viertel beziehungsweise die Hälfte der spezifischen Aktivität der Lipide der glomerulären Zellfraktion (Tab. 3). Führt man aber ein "pulse-chase" Experiment durch, also eine echte Stoßmarkierung, so nehmen innerhalb von zwei Stunden die Lipide der Basalmembranen nur bei Acetat circa ein Zwölftel, bei Glukose aber ungefähr das Dreifache und bei Glycerin etwa das Fünffache an Radioaktivität wie die Lipide der glomerulären Zellfraktion auf (Tab. 4).

Die Biosynthese der Lipide findet hauptsächlich im Zytoplasma statt (Lynen 1957, Grant 1962, Wakil 1962, Vagelos 1964, Rossiter 1968, Marinetti 1970, Thompson 1970, 1973, Kupke 1973). In Abbildung 13 sind die Wege, die dabei beschritten werden, schematisch dargestellt. Geregelt wird die Synthese durch mikrosomengebundene Enzymkomplexe (Steinberg 1963, Lynen 1967, Lane und Moss 1971, Numa und Yamashita 1974). Sie dürfte aber auch wesentlich durch Transportvorgänge beeinflusst werden, da Bildungs- und Verwendungs-ort sowohl der Vorstufen als auch der Lipide nicht unbedingt identisch sind. Der Aufbau neuer Fettsäuren aus Acetat, der über Malonyl-CoA erfolgt (Lynen 1959, Green und Allmann 1968, Stumpf 1969, Numa 1974), und die anschließende Verknüpfung mit Glycerin zu den eigentlichen Lipiden, dauert sicherlich länger als deren Bildung aus vorliegenden Fettsäuren und angebotenem Glycerin. Weiterhin nehmen die glomerulären Zellen, wie das Stoßmarkerungs-experiment zeigt, Glukose und Glycerin schneller als Acetat auf. Acetat wird außerdem zur Biosynthese von Cholesterin verwendet, die nach komplizierten Mechanismen über viele Reaktionsschritte mit dem Zwischenprodukt Mevalonsäure und Squalen abläuft (Bloch und Rittenberg 1945, Bloch et al 1946, Bloch 1965, Lynen et al 1958, 1959, Danielson und Tchen 1968).

Die Bildungsraten sind vom Precursor abhängig, wie ein Vergleich der spezifischen Aktivitäten der Basalmembranlipide zeigt (Abb. 5, B). Am höchsten sind immer die Neutrallipide markiert. Ihre spezifische Aktivität beträgt nach Inkubation der Glomeruli mit Glycerin das Dreifache, erreicht jedoch nach Gabe von Glukose, die ebenfalls als Glycerin zur Lipidsynthese verwendet wird,

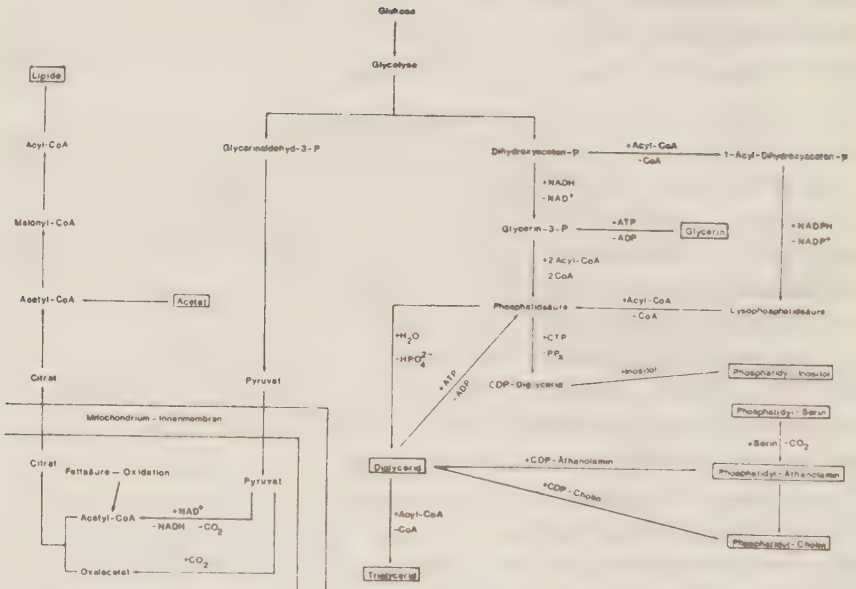


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Biosynthesewege von Lipiden

das Zehnfache der Markierung der Phosphatide. Nach Einbau von Acetat dagegen ist die spezifische Aktivität der Neutralfette nur etwa doppelt so hoch wie die der Phospholipide.

Während bei Inkubation der Glomeruli mit Glycerin oder Glukose die von den Lipiden der Basalmembranen aufgenommene Radioaktivität überwiegend in ihren Glycerinkomponenten lokalisiert ist, wird bei Angebot von Acetat die Markierung fast ausschließlich, bis auf den geringen Teil im Cholesterin, in den Fettsäuren gefunden.

Glukose wird somit vorwiegend über das Glykolyseprodukt Dihydroxyaceton-Phosphat in Glycerinphosphat und nur untergeordnet in Acetat umgewandelt, was nur in den Mitochondrien über Pyruvat erfolgen kann (Lynen et al 1963, Lowenstein 1968, 1971, Watson und Lowenstein 1970, Wakil und Barnes 1971). Das angebotene Acetat wird erwartungsgemäß zur Neubildung von Fettsäuren sowie teilweise zur Synthese von Cholesterin verwendet.

Erschwert wird eine Interpretation der Biosynthese von Lipiden dadurch, daß sie sich, solange sie innerhalb der Zelle sind, im dynamischen Zustand befinden. Sie werden ständig abgebaut und wieder aufgebaut, wobei auch die Bruchstücke zur Neusynthese verwendet werden. Hier aber im Besonderen dadurch, daß eventuell verschiedene Zellen an der Bildung der Basalmembranlipide beteiligt sein können.

5.9. Aufbau der Basalmembranen

Die renalen glomerulären Basalmembranen des Rindes bestehen nach ihrer Löslichkeit (Tab. 7) überwiegend aus sauren Proteinen. Sie werden durch starke nicht kovalente Bindungen zusammengehalten, da auch aus den reduzierten und alkylierten Membranen, in denen die Proteine denaturiert vorliegen, die meisten Puffer weder größere Mengen noch definierte Proteineinheiten lösen. Unwirksam sind auch die organischen Lösungsmittel, die selektiv Glykoproteine zu lösen vermögen, wie Phenol (Westphal et al 1952, Saliver und Sinsheimer 1969), n-Butanol (Morton 1950, Maddy 1964), α -Chloräthanol (Wallach und Zahler 1966) oder Pyridin (Blumenfeld

1968). Kollagen kann nach der üblichen Isoliermethode (Jackson und Cleary 1967) mit neutralen Salzlösungen und sauren Puffern nicht extrahiert werden.

Mit Harnstoff, Guanidiniumchlorid oder Calciumchlorid, die Wasserstoffbrücken und elektrostatische Bindungen spalten, aber auch denaturierend wirken, lassen sich Fraktionen gewinnen, die bis 30 % der eingesetzten Basalmembran betragen können. Sie haben jedoch, wie auch die Ergebnisse ähnlicher Untersuchungen bestätigen (Kefalides 1970, Hudson und Spiro 1972, Mahieu und Winand 1973, Lehotay 1975), die gleiche chemische Zusammensetzung (Kohlenhydrate, Hydroxyprolin) wie das Ausgangsmaterial. Die Fraktionen sind aber deutlich höher markiert. Bei der Gelelektrophorese ergeben sie die gleichen Muster wie die Basalmembranen.

Die Basalmembranproteine sind auch über kovalente Bindungen miteinander verbunden, an denen Disulfidbrücken einen großen Anteil haben. In geringerem Maße werden aldehyd- und esterartige sowie Amid- und Iminbindungen nachgewiesen (Kefalides und Winzler 1966, Hudson und Spiro 1972, Tanzer und Kefalides 1973, Kefalides et al 1975).

Diese Bindungen kommen auch in polymeren Kollagenen vor. Bei der Alterung des Kollagens vernetzen sie inter- und intramolekular Tropokollagen, das dadurch zu unlöslichem wird. Die Bindungen werden vorwiegend extrazellulär geknüpft und, soweit ihre Biosynthese bekannt ist, meist über die ϵ -Aminogruppe von Lysin und Hydroxylysin (Bailey 1968, Joseph und Gowri 1970, Franzblau 1971, Traub und Piez 1971, Gallop et al 1972, Patridge 1973).

Durch diese Bindungen kann aber nur der Rest vernetzt sein, der beim Lösen unter Reduktion mit Mercaptoäthanol übrigbleibt und je nach Präparation zwischen 15 und 35 % der eingesetzten Basalmembran beträgt. Seine Radiomarkierung ist bei Inkubation der Glomeruli mit $[U-^{14}C]$ -Glukose sehr unterschiedlich und kann unmeßbar gering sein, aber auch bis zu 20 % der Basalmembranaktivität betragen. Er hat die gleiche Zusammensetzung (Kohlenhydrate, Hydroxyprolin) wie die Basalmembranen. Da demnach wahrscheinlich

ist, daß Basalmembranen einem ähnlichen Alterungsprozeß wie die Kollagene unterliegen, dürfte der Einfluß dieser hochvernetzten Basalmembranstufe auf den Gesamtumsatz groß sein. Damit erklärt sich aber auch die unterschiedliche Menge und stark schwankende Radiomarkierung des unlöslichen Restes.

Über die elektrophoretischen Beweglichkeiten können bei Gelelektrophorese in einem Natriumdodecylsulfatsystem Molekulargewichte bestimmt werden (Shapiro et al 1967, Dunker und Rueckert 1969, Weber und Osborn 1969). Die Basalmembranproteine, die in das Gel eindringen, liegen danach im Bereich von 20 000 bis 300 000. Eine genaue Bestimmung der Molekulargewichte einzelner Proteine ist hier nicht möglich. Sie können nur abgeschätzt werden, da sich Glykoproteine (Bretscher 1971, Segrest et al 1971) und Kollagene (Furthmayr und Timpl 1971) anormal bei der Auftrennung verhalten. Auffallend in den elektrophoretischen Trennmustern der Basalmembranen ist das Vorkommen von Dubletten und Tripletten. Hier liegen offensichtlich Proteine vor, die sich nur gering im Molekulargewicht unterscheiden. Proteine mit geringen Unterschieden im Molgewicht, die aber von der Funktion als ein und dasselbe Protein zu betrachten sind, sind für Glykoproteine charakteristisch. Bei ihrer Biosynthese wird sehr häufig aus unbekannten Gründen der eine oder andere Zucker nicht angehängt, so daß Proteine entstehen, die sich im Aufbau ihrer Oligosacharidketten geringfügig unterscheiden. Diese Abweichungen werden als Mikroheterogenität bezeichnet (Gottschalk 1969, Huang et al 1970, Spiro 1970 a, Marshall 1972, Beeley 1974). Die Mikroheterogenität der Glykoproteine dürfte sich durch das hohe Auflösungsvermögen der Gelelektrophorese im Auftreten dieser Dubletten und Tripletten bemerkbar machen.

Da die Molekulargewichte der Basalmembranproteine sich um eine Zehnerpotenz unterscheiden, liegt es nahe, sie durch Molekularsiebung aufzutrennen. Die gute Auflösung der Gelelektrophorese wird jedoch nicht erreicht. Eine wesentliche Rolle dürfte dabei der Umstand spielen, daß sich die Basalmembranproteine über starke nicht kovalente Bindungen, die bestimmte Puffer anscheinend noch verstärken, zusammenlagern und teilweise an das Trägermaterial

binden. Auffallend ist die Bindung an vernetzte Dextrane, die viele polare Gruppen enthalten. So können auch Myers und Bartlett (1972) reduzierte und alkylierte Basalmembranen nicht an Agarose fraktionieren. In konzentrierten Lösungen der Basalmembranproteine liegen sie anscheinend in Form von Aggregaten vor, deren Bildung von trishaltigen Puffern offensichtlich begünstigt wird, da keine Auftrennung erreicht wird.

Die beste Auftrennung erreicht man in Phosphatpuffer, der allerdings Denaturantien enthalten muß, an inertem Trägermaterial, wie es in dem porösen, zur Gelchromatographie entwickelten Glas vorliegt. Begünstigt wird die Fraktionierung durch geringe Proteinkonzentration in den aufgegebenen Proben. Von den Denaturantien ist Natriumdodecylsulfat effektiver als Guanidiniumchlorid und Harnstoff, die komplexe Proteinemischungen nicht vollständig in die einzelnen Proteinbestandteile zerlegen (Triplett et al 1972) und eine geringere Löslichkeit für Glykoproteine besitzen (Marchesi und Andrews 1971). Außerdem wirkt Natriumdodecylsulfat stabilisierend auf reduzierte Bindungen (Fish et al 1970). Dodecylsulfat bildet mit Proteinen anionische stöchiometrische Komplexe, deren Größe vom Molekulargewicht der Proteine abhängt (Tanford 1968, Steinhardt und Reynolds 1969, Reynolds und Tanford 1970, Waehneltd 1975). Sie verhalten sich bei der Gelchromatographie wie globuläre Proteine (Fish et al 1970, Fish 1971), wodurch eine bessere Fraktionierung erzielt wird.

Die hier erreichte Trennung durch Molekularsiebung der reduzierten und alkylierten Basalmembranen ergibt vier Fraktionen, die sich in ihrem Gehalt an Zuckern und Hydroxyprolin unterscheiden, aber kaum in der erworbenen Radiomarkierung nach Inkubation der Glomeruli mit $\bar{U}-^{14}\bar{C}$ -Glukose. Die einzelnen Zuckerkomponenten enthalten jedoch verschiedene Anteile an der insgesamt aufgenommenen Aktivität. Die Fraktionen sind mit unterschiedlichen, aber relativ konstanten Mengen (bezogen auf gelöste Basalmembranen) am Aufbau der Basalmembranen beteiligt (Tab. 8 bis 12). In allen Fraktionen lassen sich die Zucker Galaktose, Glukose, Mannose, Fucose,

Sialinsäure und Glukosamin nachweisen, wobei, bis auf Fraktion "4", Glukose immer den höchsten Anteil stellt. Keine enthält demnach nur eine der Saccharideinheiten (Disaccharid aus Glukose und Galaktose bzw. Heteropolysaccharid aus Galaktose, Mannose, Fucose, Sialinsäure und Hexosamin), die Spiro (1967 a, b) nach vollständigem proteolytischem Abbau der Basalmembranen isolieren konnte. Die einzelnen Fraktionen lassen sich durch Gel- oder Ionenaustauschchromatographie nicht weiter auftrennen. Sie werden bei Rechromatographie, auch an Trägern mit einem anderen Fraktionierungsbereich (Abb. 11), immer als eine Fraktion eluiert. Die Gelelektrophorese zeigt jedoch, daß sie aus mehreren Proteinen zusammengesetzt sind (Abb. 10). Sie liegen je nach Präparation in unterschiedlichen Mengen vor, da man beim Vermessen der Gels von Präparation zu Präparation verschieden hohe Absorptionsgipfel für die einzelnen Proteinbanden erhält. Die einzelnen Fraktionen ergeben jedoch immer die gleichen Trennmuster, die sich nur einem bestimmten Bereich im Muster der Originalbasalmembran zuordnen lassen (Abb. 10).

Nach der chemischen Zusammensetzung entsprechen die Fraktionen "2" und "3" mit ihrem hohen Hydroxyprolinegehalt (6 bzw. 11 %) Kollagen, zumindest aber kollagenartigen Proteinen. Die Fraktionen "1" und "4" können als Glykoproteine angesehen werden, da ihr Hydroxyprolinegehalt von etwa 1 % in den unteren Erfassungs- und damit in den Unstimmigkeitsbereich der Bestimmungsmethode fällt (Stegemann 1958, Prockop und Udenfriend 1960, Woessner 1961, LeRoy et al 1964). Die meisten der bisher durchgeführten Untersuchungen zum Aufbau der glomerulären Basalmembranen lassen sich zum Vergleich nicht heranziehen, da die Proteine nicht durch chemisch-physikalische Methoden, sondern nach Einwirkung von proteolytischen Enzymen isoliert werden (Lange und Markowitz 1965, Misra und Kalant 1966, Thoenes und Hammer 1967, Huang und Kalant 1968, Kefalides 1969 b, 1971 a, Skoza und Mohos 1969, 1970, Shibata et al 1969, 1970, Skoza und Mohos 1969, 1974, McIntosh et al 1971, Bardos et al 1973, 1974, 1976, Marquardt et al 1973 b, Misra 1973, Lehotay 1975). Beim Abbau der

Basalmembranen mit den mehr oder weniger spezifischen Proteasen (Pronase, Kollagenase, Pepsin, Trypsin) werden auch hydroxyprolin-freie Glykopeptidfraktionen gewonnen. In den seltensten Fällen stimmen sie jedoch in ihren analytischen Daten überein. Teilweise dürfte die Präparationstechnik diese Unstimmigkeiten verursachen, denn die Basalmembranen werden fast ausnahmslos durch Ultraschall isoliert. Großen Einfluß haben aber auch die Enzympräparationen, die nach den Untersuchungen von Skoza und Mohos (1974) recht unterschiedlich in Reinheit und Qualität sind. Im Widerspruch zu dieser Arbeit stehen die Untersuchungen von Spiro und Mitarbeitern (Hudson und Spiro 1972, Sato und Spiro 1976). Bei gelchromatographischer Auftrennung von reduzierten und alkylierten Basalmembranen, die sie mit Ultraschall präparierten, erhielten sie mit natriumdodecylsulfathaltigem Puffer an Agarose fünf bis sechs Fraktionen. Durch Ionenaustauschchromatographie, vor allem an DEAE-Zellulose, einem Anionenaustauscher, können die einzelnen Fraktionen weiter aufgetrennt werden, so daß sich insgesamt 50 bis 58 Peptide ergeben. Jedes dieser Peptide enthält in unterschiedlichen Mengen Hydroxyprolin und Zucker. Es lassen sich immer Glukose, Galaktose, Mannose, Fucose, Sialinsäure und Hexosamin nachweisen.

Dieser krasse Unterschied kann sicherlich nicht nur durch die Zerstörung der Basalmembranen bei ihrer Isolierung mit Ultraschall verursacht werden. Möglich ist, worauf auch Spiro hinweist, daß die Basalmembranen durch Proteasen abgebaut werden, die eventuell bei der Isolierung aus den glomerulären Zellen mit in die Präparation gelangen. Proteolytische Aktivitäten können in den durch Ultraschall gewonnenen Basalmembranpräparationen nachgewiesen werden (Freytag et al 1976). Möglich ist aber auch, daß die Vielzahl der Untereinheiten teilweise nur vorgetäuscht wird, da die Gelelektrophorese des Ausgangsmaterials nur 20 bis 25 Proteinbanden zeigt. Die Protein/Dodecylsulfat-Komplexe sind sehr stabil und das Detergens läßt sich nur sehr schwer wieder entfernen (Tuszynski und Warren 1975). Daher können trotz Reinigungsschritt nach der Molekularsiebung noch geringe Mengen des Dodecylsulfats gebunden sein. Normalerweise bilden sich stöchiometrische Komplexe.

Proteine mit Mercaptogruppen aber binden unterschiedliche, nicht definierte Mengen des Detergens (Pitt-Rivers und Impiombato 1968). Dabei entstehen unterschiedlich geladene Aggregate, die bei der Ionenaustauschchromatographie nur entsprechend ihrer Ladung getrennt werden können.

Aus glomerulären Rinderbasalmembranen, die durch Homogenisation und Gradientenzentrifugation gewonnen wurden, konnte Maertin (1975) niedermolekulare Proteine extrahieren. Ihr Anteil an den Basalmembranen betrug etwa 10 %. Sie enthielten keine Zucker, aber nach Inkubation der Glomeruli mit $\boxed{\text{U-}^{14}\text{C}}$ -Glukose ca 40 % der Basalmembranradioaktivität. Die Extraktion dieser Proteine wird durch alkalische Medien und erhöhte Temperatur (40 bis 50° C) begünstigt. Sie lassen sich an Sephadex G 25 in fünf Fraktionen auftrennen.

Ähnlichkeit mit Fraktion "1" zeigt das von Kefalides (1966) durch Gelchromatographie aus reduzierten und alkylierten glomerulären Basalmembranen (Hund, Schaf) isolierte hochmolekulare (über 250 000) Glykoprotein. Es läßt sich auch aus dem Rest gewinnen, der nach Abbau der Basalmembranen mit Kollagenase bleibt (Huang und Kalant 1968). Es enthält 10 bis 12 % Zucker und Spuren an Hydroxyprolin. Die Mengenverteilung einzelner Zucker wird leider nicht angegeben. Hexosen bilden mit ca 9 % und Hexosamin mit etwa 1,5 % den Zuckeranteil.

Mahieu und Winand (1973) isolierten aus menschlichen glomerulären Basalmembranen, die sie durch Autoklavieren lösten und durch Affinitätschromatographie auftrennten, zwei Fraktionen. Die erste ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht unter 60 000 und wäre demnach Fraktion "4" vergleichbar. Es enthält 3,4 Hydroxyprolinreste pro 1000 Aminosäurereste. Der Anteil der Kohlenhydrate ist jedoch mit 9,5 % beinahe doppelt so hoch wie in Fraktion "4". Er setzt sich zusammen aus Glukose (1,2 %), Galaktose (2,1 %), Mannose (1,6 %), Fucose (0,7 %), Sialinsäure (1,5 %) und Hexosamin (2,4 %).

Ihre zweite Fraktion mit 75,1 Hydroxyprolinresten pro 1000 Aminosäurereste und einem Zuckergehalt von 9,1 % entspricht kollagenartigem Protein. Sie kann durch präparative Gelelektrophorese in vier Fraktionen getrennt werden, die sich weder im Hydroxyprolingehalt noch im Anteil und Zusammensetzung ihrer Kohlenhydrate signifikant unterscheiden. Es lassen sich die Zucker Galaktose, Mannose, Glukose, Fucose, Sialinsäure und Hexosamin nachweisen.

Die gleichen Zucker mit einem Gehalt von 8,6 %, aber in anderer Mengenverteilung, enthält auch das Protein, das Ohno et al (1975) durch Molekularsiebung aus Basalmembranen des Rindes gewannen. Sein Hydroxyprolingehalt betrug jedoch nur 43,8 Reste pro 1000 Aminosäurereste.

Ein Vergleich dieser Proteinkomponenten untereinander und mit den hier isolierten Basalmembranfraktionen ist kaum möglich, da, trotz gewisser Ähnlichkeiten, die Abweichungen im Einzelnen doch relativ groß sind. Sie dürften hauptsächlich durch die verschiedenen Präparationsmethoden sowohl der Basalmembranen als auch der Proteinkomponenten verursacht werden, teilweise aber auch durch Unterschiede in den Basalmembranen. Die Untersuchungen bestätigen jedoch den Befund dieser Arbeit, daß Glykoproteine und Kollagen am Aufbau der Basalmembranen beteiligt sind.

Das Kollagen kann durch Extraktion der Basalmembranen mit Trichloroessigsäure bei 90° C isoliert werden. Es enthält einen hohen Anteil an Zuckern (11 %), der aus Glukose (6 %) und Galaktose (5 %) besteht. Der Hydroxyprolingehalt beträgt 14 %.

Die Kollagenkomponente wird auch durch limitierten Abbau der Basalmembranen mit Pepsin oder Pronase gewonnen (Kefalides 1968, 1973, Kefalides und Denduchis 1969, Daniels und Chu 1975).

Mit dieser Methode kann man polymeres Kollagen lösen. Die Proteasen spalten dabei die C- und N-terminal gebundenen nicht helicalen Peptide ab, die sogenannten Telo peptide, greifen aber die Helix nicht an (Rubin et al 1965, Drake et al 1966). Die Telo peptide haben teil an der intra- und intermolekularen Vernetzung des Kollage

Im Gegensatz zur Extraktion mit Trichloressigsäure bleibt bei der enzymatischen Isolierung die Struktur des Kollagens erhalten. Bei Einwirkung von heißer Trichloressigsäure werden Proteine nicht nur denaturiert, sondern auch weitgehend unter Spaltung von Peptidbindungen zerstört (Langner und Newman 1972, Newman und Langner 1975, Last et al 1976). Daher ist auch eine Untersuchung der Glykoproteine der Basalmembranen nach der Kollagenextraktion wenig sinnvoll. Das Basalmembrankollagen besteht, wie auch Knorpelkollagen (Miller und Matukas 1969) aber im Gegensatz zu Haut- oder Sehnenkollagen, aus drei gleichen $\alpha 1$ -Ketten (Kefalides 1971 b). Das Molekulargewicht dieser Kette ist mit 110 000 bis 125 000 etwa 25 % größer als bei $\alpha 1$ -Ketten des interstitiellen Kollagens. Das Kollagen enthält 145 Hydroxyprolinreste pro 1000 Aminosäurereste und mit 10 Cysteinresten pro 1000 Aminosäureresten in merklicher Menge eine für Kollagene unübliche Aminosäure. Der Zuckeranteil liegt zwischen 10 und 12 % und setzt sich zu gleichen Teilen aus Glukose und Galaktose zusammen.

Nach den heutigen Kenntnissen erfolgt die Biosynthese der Kollagenketten über eine höhermolekulare Zwischenstufe (Gallop et al 1972, Grant und Prockop 1972, Prockop et al 1973, Bornstein 1974, Martin et al 1975). Die Kollagenkette hat ein Molekulargewicht von etwa 100 000, beträgt bei dieser als Prokollagen bezeichneten Zwischenstufe aber ungefähr 115 000 bis 125 000. Diese Vergrößerung wird durch vorwiegend N-terminal gebundene nicht helicale Peptide verursacht, die Cystein enthalten. Da Prokollagen bisher in ausreichenden Mengen nicht gewonnen werden konnte, war eine genaue Charakterisierung dieser Peptide bisher nicht möglich. Es handelt sich aber möglicherweise um saure Glykopeptide (Lapière et al 1973). Prokollagen ist eine Transportform des Kollagens, in der es aus der synthetisierenden Zelle geschleust wird. Extrazellulär wird es dann durch Enzyme in das eigentliche Kollagen umgewandelt.

Die große Ähnlichkeit zwischen Prokollagen und Basalmembrankollagen ist offensichtlich. Anscheinend findet die extrazelluläre Umwandlung bei Basalmembranen nicht statt und daher zeigen sie bei

morphologischen Untersuchungen auch nicht die für Kollagene typische Querstreifung. Dafür, daß Basalmembrankollagen nicht umgewandelt wird, sprechen auch Untersuchungen der Biosynthese des Kollagens aus Prolin (Grant et al 1975, Kefalides et al 1976, Minor et al 1976, Williams et al 1976).

Das Kollagen muß durch starke Bindungen mit Glykoproteinkomponenten verbunden sein, da es nur durch Zerstörung der Basalmembranen isoliert werden kann. Im Bindegewebe können Glykoprotein/Kollagen-Komplexe nachgewiesen werden, die über kovalente Bindungen verknüpft sind (Anderson und Jackson 1972, Tanzer et al 1972, Kobayashi und Pedrini 1973, Bankowski et al 1975). Diese Bindungen werden teilweise bei mehrstündigem Erhitzen gespaltet (Jackson et al 1974). In Kulturen des embryonalen parietalen Dottersacks der Ratte wird, wie vor allem autoradiographische Untersuchungen zeigten, das Basalmembrankollagen gebunden an Glykoprotein sezerniert (Clark et al 1975, Minor et al 1975, 1976).

Ein ähnlicher Komplex dürfte in Fraktion "3" vorliegen, die nach dem Hydroxyprolingehalt Basalmembrankollagen enthält, nach der Kohlenhydratzusammensetzung aber auch Glykoprotein. Dafür spricht auch die hohe Markierung des Zuckeranteils (32 % der Gesamtaktivität) sowie der hohe Anteil der Zuckerradioaktivität, der auf die für das Kollagen typischen Zucker Glukose (17 %) und Galaktose (10 %) entfällt und in keiner anderen Fraktion erreicht wird. Möglicherweise liegt hier aber auch schon ein ursprünglich sezernierter Kollagen/Glykoprotein-Komplex verbunden mit dem Glykoprotein der Fraktion "4" vor.

Die Fraktion "2" mit ihrem größten Molekulargewicht, geringerem Hydroxyprolingehalt, aber nahezu gleichem Kohlenhydratgehalt wie Fraktion "3" könnte eine Verbindung der Fraktionen "3" und "4" sein. Sie wäre damit die Vorstufe zu den hochvernetzten Basalmembranen, die beim Lösen unter Reduktion übrigbleiben und durch Bindung des Glykoproteins der Fraktion "1" entstehen dürften.

Dafür spricht auch, daß die von den Basalmembranen aufgenommene Radioaktivität sich auf die einzelnen Fraktionen nahezu entsprechend den Mengen verteilt, mit der sie am Aufbau der Basal-

membranen beteiligt sind. Bedingt durch den kontinuierlichen Prozeß der extrazellulären Verknüpfung werden die Proteine gleich schnell aufgebaut. Die unterschiedlichen Raten, mit denen die definierten Proteinbausteine der Basalmembranen intrazellulär synthetisiert werden, zeigen sich in den unterschiedlich hohen Anteilen an der insgesamt aufgenommenen Radioaktivität, die auf die Zuckerkomponenten entfallen.

6. Zusammenfassung

Noch stoffwechselaktive Glomeruli werden mit einem Siebverfahren aus der Rinde von Rindernieren isoliert. Innerhalb der Inkubationszeit von zwei Stunden verwerten sie die in vitro angebotenen radioaktiven Substanzen ($[U-^{14}C]$ -Acetat, $[U-^{14}C]$ -Glukose, $[U-^{14}C]$ -Glycerin) auch zur Biosynthese von Bestandteilen ihrer glykoproteinartigen extrazellulären Basalmembranen. Die Basalmembranen, die nach Zerstörung der Glomeruli durch Homogenisation durch Zentrifugation über einen Saccharosegradienten gewonnen werden, sind eindeutig radiomarkiert.

Die Basalmembranen enthalten im Gegensatz zu denen, die nach Zerstörung des glomerulären Zellverbandes durch Ultraschall gewonnen werden, der am häufigsten angewandten Präparationstechnik, einen konstanten Lipidgehalt von 4,5 %. Sie stimmen aber im Zucker- (8,4 %) und Hydroxyprolingehalt (6,5 %) überein. Die Basalmembranlipide setzen sich zusammen aus 14 % Neutrallipiden, 46 % Phosphatiden und 38 % Cholesterin.

Die Möglichkeit, daß sie eine Verunreinigung der Präparation sind, ist nach Vergleich mit Menge und Zusammensetzung der Lipide der übrigen glomerulären Bestandteile, die als glomeruläre Zellfraktion aus den Überständen nach Abtrennung der Basalmembranen isoliert werden, auszuschließen. Die glomeruläre Zellfraktion enthält einen Lipidanteil von 11 %, der aus 16 % Neutralfetten, 54 % Phospholipiden und 31 % Cholesterin besteht. Daß die Lipide integraler Bestandteil der Basalmembranen sind, zeigt sich auch in der unterschiedlichen Verwertung von $[U-^{14}C]$ -Glukose und der eigentlichen Precursoren bei der Lipidsynthese - $[U-^{14}C]$ -Acetat und $[U-^{14}C]$ -Glycerin - zur Biosynthese der Basalmembranlipide und der Lipide der glomerulären Zellfraktion. Sie erreichen niemals die gleichen spezifischen Aktivitäten.

Bei Angebot von Acetat und Glycerin werden 0,2 bis 0,5 % der Radioaktivität in den Basalmembranen wiedergefunden, wobei 56 bzw. 72 % der Basalmembranaktivität auf ihre Lipide entfallen. Die Verwertung

dieser Substanzen zur Biosynthese anderer Basalmembranbestandteile wird nicht untersucht. Die Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen Lipidklassen ist vom Precursor abhängig. Die höchste spezifische Markierung erreichen jedoch immer die Neutral-lipide.

Bei Inkubation mit [$\bar{U}$ - $^{14}\bar{C}$]-Glukose wird 0,02 bis 0,05 % der angebotenen Radioaktivität in die Basalmembranen eingebaut. Die Lipide enthalten danach 21 % der Basalmembranaktivität. 28 % werden im Zuckeranteil der Basalmembranen wiedergefunden, der sich zusammensetzt aus Galaktose (30,8 %), Glukose (30,3 %), Mannose (9,2 %), Fucose (7,4 %), Sialinsäure (6,4 %) und Glukosamin (15,9 %). Alle Zucker sind radiomarkiert. Die höchsten spezifischen Aktivitäten erreichen Fucose und Glukosamin.

Nach Reduktion mit Mercaptoäthanol können die Basalmembranen gelelektrophoretisch aufgetrennt werden. Es ergeben sich 18 Proteinbanden, die nach ihrer Anfärbbarkeit mit der Perjodsäure-Schiff-Reaktion alle Zucker enthalten. Die Molekulargewichte der Proteine liegen im Bereich zwischen 20 000 und 300 000.

Die Basalmembranen zeigen eine geringe Löslichkeit. In neutralen und sauren Puffern sind sie praktisch unlöslich. Im Alkalischen unter denaturierenden Bedingungen werden bis zu 30 % gelöst. Nach Reduktion und Alkylierung der Mercaptogruppen können in Puffern (pH: 6,0 bis 9,0), die Denaturantien enthalten, bis zu 85 % in Lösung gehen. Mit heißer Trichloressigsäure läßt sich das Kollagen extrahieren. Andere definierte Proteinuntereinheiten werden durch Extraktion der Basalmembranen nicht gewonnen.

Das Basalmembrankollagen enthält 11 % Zucker und 14 % Hydroxyprolin. An Zuckern lassen sich nur Glukose (6 %) und Galaktose (5 %) nachweisen. Nach Inkubation der Glomeruli mit radioaktiver Glukose entfallen 13 % der von den Basalmembranen aufgenommenen Radioaktivität auf das Kollagen. 65 % der Kollagenaktivität finden sich in der Glukose und 35 % in der Galaktose.

Bei Molekularsiebung der reduzierten und alkylierten Basalmembranen ergeben sich vier Fraktionen. Alle Fraktionen enthalten

in unterschiedlichen Mengen die Zucker Galaktose, Glukose, Mannose, Fucose, Sialinsäure und Glukosamin. Die von den Basalmembranen aufgenommene Radioaktivität verteilt sich auf die einzelnen Fraktionen entsprechend der Menge, mit der sie am Aufbau der Basalmembranen beteiligt sind. Ihre Zuckeranteile sowie die einzelnen Zuckerkomponenten sind jedoch unterschiedlich markiert. Die Fraktionen sind aus mehreren Proteinen zusammengesetzt, wie sich gelelektrophoretisch zeigen läßt, können aber weder durch Gel- noch durch Ionenaustauschchromatographie in die einzelnen Proteinuntereinheiten zerlegt werden.

Die Fraktionen mit dem höchsten und niedrigsten Molekulargewicht ("1" und "4") entsprechen Glykoproteinen. Fraktion "1" mit einem Zuckergehalt von 14 % ist mit 9 % und Fraktion "4", die 5 % Zucker enthält, mit 15 % am Aufbau der Basalmembranen beteiligt. Die Fraktionen "2" und "3", deren Anteile an den gelösten Basalmembranen 27 und 46 % betragen, enthalten 6 bzw. 11 % Hydroxyprolin und demnach das Basalmembrankollagen. Ihr Zuckergehalt beträgt 8 bzw. 9 %.

Der Zuckeranteil der Fraktion "4" ist mit 69 % der Gesamtaktivität am höchsten markiert, davon entfallen alleine 59 % auf Glukosamin. In den Fraktionen "2" und "3" enthalten die Zucker 24 bzw. 32 % der insgesamt aufgenommenen Radioaktivität. In Fraktion "3" entfallen davon 27 % auf Glukose (17 %) und Galaktose (10 %), die in keiner anderen Fraktion gleich hohe Werte erreichen. Die Radiomarkierung der Zucker in Fraktion "1" beträgt 12 % der Gesamtaktivität. Fucose und Sialinsäure enthalten mit je 31 % der Zuckeraktivität den größten Anteil.

Die glomerulären Basalmembranen des Rindes bestehen aus Lipiden, Kollagen und Glykoproteinen. Den größten Anteil stellt das Kollagen, den geringsten die Lipide. Eindeutig nachweisen lassen sich zwei Glykoproteine, die sich im Zuckergehalt und Molekulargewicht unterscheiden. Das Vorkommen eines dritten Glykoproteins ist nicht auszuschließen. Es besteht die Möglichkeit, daß es kovalent gebunden an das Kollagen sezerniert wird. Die Kollagenkomponente liegt höchstwahrscheinlich in Form von Prokollagen vor.

Den größten biologischen Umsatz zeigen die Lipide, den geringsten das Kollagen. Auf verschiedene Bildungsraten der einzelnen Proteinkomponenten weist die unterschiedliche Verwertung der angebotenen radioaktiven Glukose zur Synthese der Zuckeranteile hin. Die einzelnen Bestandteile werden extrazellulär kontinuierlich durch Ausbildung kovalenter Bindungen vernetzt und dadurch in die weitgehend unlöslichen Basalmembranen überführt.

7. Literatur

- AMON, H., Gayer, J. (1963)
Klin. Wschr. 41, 163 - 172
- ANDERSON, J.C., Jackson, D.S. (1972)
Biochem. J. 127, 179 - 186
- ANDRES, G.A., Morgan, C., Hsu, K.C., Rifkin, R.A.
Seegal, B.C. (1962)
J. Exp. Med. 115, 929 - 935
- ANDRES, G.A., Accini, L., Hsu, K.C., Seegal, B.C. (1970)
in: Chem. Mol. Biol. Intercell. Matrix, Vol 1, 575 - 589
Ed: Balazs, E.A.
Academic Press, London, New York
- ARAKAWA, M. (1970)
Lab. Invest. 23, 489 - 496
- ASHHURST, D.E. (1968)
Ann. Rev. Entomol. 13, 45 - 74
- ASHTON, N. (1974)
Brit. J. Ophthal. 58, 344 - 366
- ASHWORTH, C.T., Erdman, R.R., Arnold, N.J. (1960)
Am. J. Pathol. 36, 165 - 175
- BACH, J.F., Dardenne, H., Hinglais, N., Mahieu, P. (1972)
in: Actualités Néphrologiques de l'Hôpital Necker, 73-91
Flammarion, Paris
- BAILEY, A.J. (1968)
in: Compr. Biochem., Vol. 26 B, 297 - 423
Ed: Florkin, M., Stotz, E.H.
Elsevier Publ. Comp., Amsterdam
- BANKOWSKI, E., Gindzienski, A., Pawlicka, E., Rzezeczycki, W. (1975)
Mol. Cell. Biochem. 8, 23 - 30
- BARDOS, P., Muh, J.F. (1975)
Ann. Biol. clin. 33, 335 - 349
- BARDOS, P., Lanson, M., Muh, J.P., Degand, P. (1973)
Clin. Chim. Acta 48, 27 - 35
- BARDOS, P., Lanson, M., Muh, J.P., Degand, P. (1974)
Experientia 30, 874 - 876
- BARDOS, P., Muh, J.P., Luthier, B., Devulder, B., Tacquet, A. (1976)
Comp. Biochem. Physiol. 53 B, 49 - 56
- BARDOS, P., Lanson, M., Degand, P., Gutman, N., Garrique, M.A.,
Muh, J.P. (1976 b)
FEBS Letters 64, 385 - 390

- BARGMANN, W. (1958)
Dtsch. Med. Wschr. 83, 1704 - 1710
- BARGMANN, W., Knoop, A., Schieblar, T.H. (1955)
Z. Zellforsch. 42, 386 - 422
- BARGMANN, W., Knoop, A. (1956)
Z. Zellforsch. 44, 263 - 281
- BARTLETT, P., Tu, M.H., Katona, L., Glotzhober, D. (1975)
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 10, 673 - 680
- BEELEY, J.G. (1974)
Biochem. Soc. Symp. 40, 27 - 36
- BEISSWENGER, P.J. (1973)
Diabetes 22, 744 - 750
- BEISSWENGER, P.J. (1976)
J. Clin. Invest. 58, 844 - 852
- BEISSWENGER, P.J., Spiro, R.G. (1970)
Science 168, 596 - 598
- BEISSWENGER, P.J., Spiro, R.G. (1973)
Diabetes 22, 180 - 193
- BENNETT, H.S., Luft, J.H., Hampton, J.C. (1959)
Am. J. Physiol. 196, 381 - 390
- BERGSTRAND, A. (1957)
Lab. Invest. 6, 191 - 204
- BERGSTRAND, A., Bucht, H. (1958)
Z. Zellforsch. 48, 51 - 73
- BERNIK, M.B. (1969)
Nephron 6, 1 - 10
- BLÄKER, F., Hellwege, H.H., Henningsen, B., Maintz, J. (1972)
Der Urologe 11 A, 1 - 7
- BLAU, E., Michael, A.F. (1971)
J. Lab. clin. Med. 77, 97 - 109
- BLAU, E., Michael, A.F. (1972)
Proc. Exp. Biol. Med. 141, 164 - 172
- BLAU, E., Haas, J.E. (1973)
Lab. Invest. 28, 477 - 481
- BLIGH, E.G., Dyer, W.J. (1959)
Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911 - 917

- BLOCH, K. (1965)
Science 150, 19 - 28
- BLOCH, K., Rittenberg, D. (1945 a)
J. Biol. Chem. 159, 45 - 58
- BLOCH, K., Rittenberg, D. (1945 b)
J. Biol. Chem. 160, 417 - 424
- BLOCH, K., Borch, E., Rittenberg, D. (1946)
J. Biol. Chem. 162, 441 - 449
- BLOOM, P.M., Hartmann, J.F., Vernier, R.L. (1959)
Anat. Rec. 133, 251 (abstr.)
- BLUMENFELD, O.O. (1968)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 30, 200 - 205
- BONGARTZ, F. (1976)
persönliche Mitteilung
- BORNSTEIN, P. (1974)
Ann. Rev. Biochem. 43, 567 - 603
- BORNSTEIN, P., Monson, J.M., Murphy, W.H., Kruse, N.J. (1975)
in: Extracell. Matrix Influences on Gene Expression, 95-100
Ed: Slavkin, H.C., Greulich, R.C.
Academic Press, London, New York
- BRAUN-FALCO, O. (1955)
Arch. klin. exp. Derm. 201, 521 - 530
- BRAY, G.A. (1960)
Anal. Biochem. 1, 279 - 285
- BRENDEL, K., Meezan, E. (1973)
J. Pharmacol. Exp. Ther. 187, 342 - 351
- BRENNER, B.M., Baylis, C., Deen, W.M. (1976)
Physiol. Rev. 56, 502 - 534
- BRETSCHER, M.G. (1971)
Nature (London) 231, 229 - 232
- BRUCHHAUSEN, v.F. (1969)
in: Int.Symp. Biochemie der Gefäßwand, 298 - 328
Karger, Basel
- BRUCHHAUSEN, v.F. (1971)
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 268, 83 - 95
- BRUCHHAUSEN, v.F., Merker, H.J. (1965 a)
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Pathol.Pharmacol. 251, 1-12
- BRUCHHAUSEN, v.F., Merker, H.J. (1965 b)
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Pathol.Pharmacol. 251, 168 a

- BRUCHHAUSEN, v.F., Merker, H.J. (1966)
in: Krücks Aktuelle Probleme der Nephrologie, 758 - 759
Springer, Berlin, Heidelberg, New York
- BRUCHHAUSEN, v.F., Merker, H.J. (1967)
Histochemie 8, 90 - 108
- BRUNS, R.E., Palade, J.E. (1968)
J. Cell Biol. 37, 244 - 276
- BURLINGTON, H., Cronkite, E.P. (1973)
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 142, 143 - 149
- BURTON, K. (1956)
Biochem. J. 62, 315 - 323
- BUSS, H., Lamberts, B., Renner, D. (1971)
Z. ges. exp. Med. 156, 216 - 231
- BUTLER, W.T., Cunningham, L.W. (1965)
J. Biol. Chem. 240, PC 3449
- BUTLER, W.T., Cunningham, L.W. (1966)
J. Biol.Chem. 241, 3882 - 3888
- CAPUTTO, R., Berra, H.S, Cumar, F.A. (1967)
Ann. Rev. Biochem. 36, 211 - 246
- CARLSON, L.A., Waldström, L. (1959)
Clin. chim. Acta, 4. 197 - 205
- CAULFIELD, J.P., Farquhar, M.G. (1974 a)
J. Cell. Biol. 63, 883 - 903
- CAULFIELD, J.P., Farquhar, M.G. (1974 b)
J. Cell. Biol. 63 (2 Pt. 2) 53 a (abstr.)
- CAULFIELD, J.P., Farquhar, M.G. (1975)
J.Exp. Med. 142, 61 - 83
- CHIQUOINE, A.D. (1961)
Anat. Rec. 139, 29 - 36
- CHIU, J., Drummond, K.N. (1972)
Am. J. Pathol. 68, 391 - 406
- CHOW, A.Y.K., Drummond, K.N. (1969)
Lab. Invest. 20, 213 - 218
- CHURG, J., Grishman, E. (1975)
Kidney Intern. 7, 254 - 270
- CLARK, C.C., Tomichuk, E.A., Koszalka, T.R., Brent, R.L.,
Kefalides, N.A. (1973)
Abstr. 9th Int. Congr. Biochem., 423
- CLARK, C.C., Tomichuk, E.A., Koszalka, T.R., Minor, R.R.,
Kefalides, N.A. (1975 a)
J. Biol. Chem. 250, 5259 - 5267

- CLARK, C.C., Minor, R.R., Koszalka, T.R., Brent, R.L.,
Kefalides, N.A. (1975 b)
Dev. Biol. 46, 243 - 261
- COHEN, M.P., Vogt, C. (1972)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 1542 - 1546
- COHEN, M.P., Vogt, C. (1975)
Biochim. Biophys. Acta 393, 78 - 87
- COOK, W.F., Pickering, J.W. (1958)
Nature (London) 182, 1103 - 1104
- COSSEL, L., Lisewski, G., Mohnike, J. (1959)
Klin. Wschr. 37, 1005 - 1018
- COURCHAINE, A.J., Miller, W.H., Stein Jr., D.B. (1959)
Clin. Chem. 5, 609 - 614
- CROFT, D.N., Lubran, M. (1965)
Biochem. J. 95, 612-620
- DANIELS, J.R., Chu, J.H. (1975)
J. Biol. Chem. 250, 3531 - 3537
- DANIELSON, H., Tchen, T.T. (1968)
in: Metabolic Pathways, 2nd Ed., Vol. 2, 118 - 168
Ed: Greenberg, D.M.
Academic Press, London, New York
- DEDONDER, R.A. (1961)
Ann. Rev. Biochem. 30, 347 - 382
- DENDUCHIS, B., Kefalides, N.A. (1970)
Biochim. Biophys. Acta 221, 357 - 366
- DENDUCHIS, B., Kefalides, N.A., Bezkorovainy, A. (1970)
Arch. Biochem. Biophys. 138, 582 - 589
- DEODHAR, S.D., Cuppage, F.E., Gableman, E. (1964)
J. Exp. Med. 120, 677 - 690
- DISCHE, R.M., Pappas, G.D., Grauer, A., Dische, Z. (1965)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 20, 63 - 70
- DISCHE, Z. (1964)
in: Small Blood Vessel Involvement in Diabetes Mellitus, 201
Ed: Siperstein, M.D., Colwell, A.R., Meyer, K.
Amer.Inst. Biol. Sci., Washington, DC
- DISCHE, Z., Shettles, L.B. (1948)
J. Biol. Chem. 175, 595 - 603
- DISCHE, Z., Zelmenis, G., Rothschild, C. (1967)
Arch. Biochem. Biophys. 121, 685 - 694

- DITTMER, J.C., Wells, M.N. (1969)
in: Methods Enzymol, 14, 482 - 530
Ed: Colowick, S.B., Kaplan, N.O.
Academic Press, London, New York
- DIXON, F.J., Wilson, C.B., Marquardt, H. (1971)
in: Actualités Néphrologiques de l'Hôpital Necker, 7 - 10
Flammarion, Paris
- DOHLMAN, C.H., Balazs, E.A. (1955)
Arch. Biochem. Biophys. 57, 445 - 457
- DUBACH, U.C., Recant, L. (1960)
J. Clin. Invest. 39, 1364 - 1371
- DUNKER, A.K., Rueckert, R.R. (1969)
J. Biol. Chem. 244, 5074 - 5080
- DRAKE, M.P., Davison, P.F., Bump, S., Schmitt, F.O. (1966)
Biochemistry 5, 301 - 312
- EGGSTSTEIN, M. (1966)
Klin. Wschr. 44, 267 - 273
- EGGSTSTEIN, M., Kreutz, F.H. (1966)
Klin. Wschr. 44, 262 - 267
- ELSON, L.A., Morgan, W.T.J. (1933)
Biochem. J. 27, 1824 - 1828
- FAHIMI, H.D. (1973)
J. Histochem. Cytochem. 21, 999 - 1009
- FARQUHAR, M.G. (1964)
in: Small Blood Vessel. Involment in Diabetes Mellitus, 31 - 38
Ed: Siperstein, M.D., Colwell, A.R., Meyer, K.
Amer. Inst. Biol. Sci., Washington, D.C.
- FARQUHAR, M.G. (1975)
Kidney Intern. 8, 197 - 211
- FARQUHAR, M.G., Palade, G.E. (1959)
Anat. Rec. 133, 378 - 389
- FARQUHAR, M.G., Palade, G.E. (1961)
J. Exp. Med. 114, 699 - 716
- FARQUHAR, M.G., Palade, G.E. (1962)
J. Cell Biol. 13, 55 - 87
- FARQUHAR, M.G., Hopper Jr., J., Moon, H.D. (1959)
Am. J. Pathol. 35, 721 - 754

- FARQUHAR, M.G., Wissig, G.L., Palade, G.E. (1961)
J. Exp. Med. 113, 47 - 66
- FELGENHAUER, K. (1968)
Biochim. Biophys. Acta 160, 267 - 269
- FERWERDA, W., Mejer, J.F.M., van den Eijnden, D.H., van Dijk, W. (1970)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 976 - 984
- FISH, A.J., Brown, D.M., Vernier, R.L., Michael, A.F. (1972)
J. Clin. Invest. 51, 32 a
- FISH, A.J., Michael, A.F., Vernier, R.L., Brown, D.M. (1975)
Lab. Invest. 33, 330 - 341
- FISH, W.W. (1971)
Agricult. Food Chem. 19, 660 - 664
- FISH, W.W., Reynolds, J.A., Tanford, C. (1970)
J. Biol. Chem. 245, 5166 - 5168
- FISHER, E.R., Hellstrom, H.R. (1962)
Lab. Invest. 11, 617 - 637
- FITCH, S.M., Harkness, M.L.R., Harkness, R.D. (1955)
Nature (London) 176, 163
- FONG, J.S.C., Drummond, K.N. (1968)
J. Lab. Clin. Med. 71, 1034 - 1039
- FONG, J.S.C., Drummond, K.N. (1969)
Lab. Invest. 20, 512 - 515
- FOWLER, B.A. (1970)
Histochemie 22, 155 - 162
- FRANZBLAU, C. (1971)
in: Compr. Biochem. 26 C, 659 - 712
Ed: Florkin, M., Stotz, E.H.
Elsevier Publ. Comp., Amsterdam
- FRIEDERICI, H.H.R., Tucker, W.R., Schwartz, T.B. (1966)
Diabetes 15, 233 - 250
- FREYTAG, J.W., Ohno, M., Hudson, B.G. (1976)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 72, 796 - 802
- FUCHS, K. (1966)
Gegenbaur morphol. Jahrb. 109, 295 - 302
- FUNG, K.K., Kalant, N. (1972)
Biochem. J. 129, 733 - 741

- FUKUSHI, S., Spiro, R.G. (1969)
J. Biol. Chem. 244, 2041 - 2048
- FURTHMAYR, H., Timpl, R. (1971)
Anal. Biochem. 41, 510 - 516
- GALBRAITH, G.L. (1971)
Scot. med. J. 16, 428 - 437
- GALLOP, P.M., Blumenfeld, O., Seifter, S. (1972)
Ann. Rev. Biochem. 41, 617 - 672
- GANG, N.F. (1969)
Clin. Res. 17, 672 (abstr.)
- GANG, N.F. (1970 a)
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 135, 223 - 227
- GANG, N.F. (1970 b)
Am. J. Clin. Pathol. 53, 267 - 269
- GANG, N.F., Kalant, N. (1970)
Lab. Invest. 22, 531 - 540
- GANG, N.F., Trachtenberg, E., Allerhand, J., Kalant, N.,
Mautner, W. (1970)
Lab. Invest. 23, 436 - 441
- GARDELL, S. (1953)
Acta chem. Scand. 7, 207 - 215
- GEKLE, D., Merker, H.J. (1966)
Klin. Wschr. 44, 1217 - 1224
- GEKLE, D., Bruchhausen, v.F., Fuchs, G. (1966 a)
Pflügers Arch. ges. Physiol. 289, 180 - 190
- GEKLE, D., Oelert, H., Baumann, K., Bruchhausen, v.F. (1966 b)
Pflügers Arch. ges. Physiol. 289, R 79
- GERSH, I., Catchpole, H.R. (1949)
Am. J. Anat. 85, 457 - 521
- GEYER, J., Linss, W., Schaaf, P., Möller, I., Müller, A. (1970)
Acta histochem. 35, 67 - 74
- GINSBURG, V. (1964)
in: Advan. Enzymol. 26, 35 - 88
Ed: Nord, F.F.
Interscience Publ., New York
- GINSBURG, V., Neufeld, E.F. (1969)
Ann. Rev. Biochem. 38, 371 - 388

- GLÖCKNER, R., Hutschenreiter, J., Scheuner, G. (1974)
Acta histochem. 49, 123 - 127
- GOODMAN, M., Greenspon, S.A., Krakower, C.A. (1955)
J. Immunol. 75, 96 - 104
- GOTTSCHALK, A. (1963)
Ann. N.Y. Acad. Sci. 106, 168 - 176
- GOTTSCHALK, A. (1966)
in: Glykoproteine, 20 - 28
Ed: Gottschalk, A.
Elsevier Publ. Comp., Amsterdam
- GOTTSCHALK, A. (1969)
Nature (London) 222, 452 - 454
- GOULD, B.S. (1968)
in: Treatise on Collagen, Vol. 2 A, 139 - 188
Ed: Gould, B.S.
Academic Press, London, New York
- GRAHAM, R.C., Karnovsky, M.J. (1966)
J. Exp. Med. 124, 1123 - 1134
- GRAHAM, R.C., Kellermeyer, R.W. (1968)
J. Histochem. Cytochem. 16, 275 - 278
- GRANT, J.K. (1962)
in: Compar. Biochem. 3, 163 - 203
Ed: Florkin, M., Mason, H.S.
Academic Press, London, New York
- GRANT, M.E., Prockop, D.J. (1972)
New Engl. J. Med. 286, 194 - 199, 242 - 249, 291 - 300
- GRANT, M.E., Harwood, R. (1974)
Biochem. Soc. Trans. 2, 624 - 625
- GRANT, M.E., Kefalides, N.A., Prockop, D.J. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 3539 - 3544, 3545 - 3551
- GRANT, M.E., Schofield, J.D., Kefalides, N.A., Prockop, D.J. (1973)
J. Biol. Chem. 248, 7432 - 7437
- GRANT, M.E., Harwood, R., Williams, I.F. (1975)
Eur. J. Biochem. 54, 531 - 540
- GRANT, M.E., Harwood, R., Williams, I.F. (1976)
J. Physiol. 257, 56 P (abstr)
- GRAUMANN, W. (1964)
in: Handbuch der Histochemie, Vol. 2/2, 89 - 92
Ed: Graumann, W., Neumann, K.
Thieme, Stuttgart

- GREEN, D.E., Allman, D.W. (1968)
in: Metabolic Pathways, 2nd Ed. Vol. 2, 38 - 67
Ed: Greenberg, D.M.
Academic Press, London, New York
- GREENSPON, S.A., Bollinger, F.W., Krakower, C.A. (1952)
Fed. Proc. 11, 416 - 417
- GREGOIRE, F. (1975)
Kidney Intern. 7, 86 - 93
- GRONOWSKI, J.W., Biczyskova, W., Walski, M. (1969)
J. Cell Biol. 40, 585 - 601
- GROSS, J. (1963)
in: Compar. Biochem. 5,
Ed: Florkin, N., Mason, H.S.
Academic Press, London, New York
- GUTTMAN, P.H., Kohn, H.I. (1960)
Am. J. Pathol. 37, 293 - 307
- HALL, B.V. (1953)
Proc. Ann. Conf. Nephrotic Syndrome, 5th Conf., 1 - 39
- HALL, B.V. (1954)
Proc. Ann. Conf. Nephrotic Syndrome, 6th Conf., 1 - 40
- HAY, E.D. (1968)
in: Epithelial-Mesenchymal Interaction, 31 - 55
Ed: Fleischmajer, R., Billingham, R.E.
Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland
- HAY, E.D., Revel, J.P. (1969)
Fine Structure of the Developing Avian Cornea
Karger, Basel
- HEATH, E.C. (1971)
Ann. Rev. Biochem. 40, 29 - 56
- HEILHECKER, A., Bruchhausen, v.F. (1973)
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 277, R 28 (abstr.)
- HEILHECKER, A., Bruchhausen, v.F. (1976)
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 294, R 3 (abstr.)
- HEMPEL, E., Geyer, G. (1967)
Anat. Anz. 120, 84 - 90
- HERBERG, M. J. (1965)
Packard Techn. Bull. 15
Packard Instruments Intern., Zürich
- HERMAN, R.H. (1971)
Am. J. Clin. Nutr. 24, 488 - 498

- HOLLMANN, S. (1961)
in: Biochemie und Klinik
Ed: Weitzel, G., Zöllner, N.
Thieme, Stuttgart
- HOUGH, L., Jones, J.K.N. (1956)
Adv. Carbohydr. Chem. 11, 185 - 261
- HUANG, C.C., Mayer, H.E., Montgomery, R (1970)
Carbohydr. Res. 13, 127 - 137
- HUANG, F., Kalant, N. (1968)
Can. J. Biochem. 46, 1523 - 1532
- HUANG, F., Hutton, L., Kalant, N. (1967)
Nature (London) 216, 87 - 88
- HUDSON, B.G., Spiro, R.G. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 4229 - 4238, 4239 - 4247
- HUGHES, A.F.W. (1943)
J. Anat. 77, 266 - 287
- HUHN, D., Steiner, J.W., Movat, H.Z. (1962)
Z. Zellforsch. 56, 213 - 230
- HUNT, T.E. (1937)
Anat. Rec. 68, 449 - 460
- JACKSON, D.S., Cleary, E.G. (1967)
Methods Biochem. Anal. 15, 25- 26
- JACKSON, D.S., Ayad, S., Mechanic, G. (1974)
Biochim. Biophys. Acta, 336, 100 - 107
- JAKUS, M.A. (1956)
J. Biophys. Biochem. Cytol. 2 (Suppl. 4) 243 - 252
- JAKUS, M.A. (1964)
Ocular Fine Structure
Little and Brown, Boston, MA
- JØRGENSEN, F. (1966)
Ultrastructure of the Normal Human Glomerulus
Munksgaard, Kopenhagen
- JØRGENSEN, F. (1967)
Lab. Invest. 17, 416 - 424
- JØRGENSEN, F., Bentzon, M.W. (1968)
Lab. Invest. 18, 42 - 48
- JOHNSON, L.D., Starcher, B.C. (1972)
Biochim. Biophys. Acta 290, 158- 167

- JONES, D.B. (1969)
Lab. Invest, 21, 119 - 125
- JONES, D.B., Mueller, D.B., Menefee, M. (1962)
Am. J. Pathol. 41, 373 - 388
- JOSEPH, K.T., Gowri, C. (1970)
J. Sci. Indus. Res. 29, 504 - 514
- KALANT, N., Misra, R.P., Manley, R.St.J., Wilson, J. (1966)
Nephron 3, 167 - 172
- KAPLAN, B.S., Renaud, L., Drummond, K.N. (1974)
Kidney Intern. 6, 170 - 176
- KAPLAN, B.S., Renaud, L., Drummond, K.N. (1976)
Lab. Invest. 34, 174 - 178
- KARNOVSKY, M.J. (1974)
in: Biol. Electron Microscopy 130- 131
Ed: Sanders, J.V., Goodchild, D.J.
Austral. Acad. Sci., Canberra
- KARNOVSKY, M.J., Ainsworth, S.K. (1973)
Adv. Nephrol. 2, 35 - 60
- KARRER, H.E. (1956'a)
J. Biophys. Biochem. Cytol. 2, 241 - 252
- KARRER, H.E. (1956 b)
J. Biophys. Biochem. Cytol. 2, (Suppl.) 287 - 292
- KARRER, H.E. (1958)
J. Ultrastruct. Res. 2, 96 - 121
- KEFALIDES, N.A. (1966)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 22, 26 - 32
- KEFALIDES, N.A. (1968)
Biochemistry 7, 3103 - 3112
- KEFALIDES, N.A. (1969 a)
Arthr. Rheum. 12, 427 - 443
- KEFALIDES, N.A. (1969 b)
in: Proc. 6th Congr. Intern. Diabetes Fed., 307 - 322
Ed: Ostman, J.
Excerpta Med. Found., Amsterdam
- KEFALIDES, N.A. (1970)
in: Chem. Mol. Biol. Intercell. Matrix, Vol. 1, 535 - 573
Ed: Balazs, E.A.
Academic Press, London, New York

- KEFALIDES, N.A. (1971 a)
Int. Rev. Exp. Pathol. 10, 1 - 19
- KEFALIDES, N.A. (1971 b)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 226 - 234
- KEFALIDES, N.A. (1972 a)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 1151 - 1158
- KEFALIDES, N.A. (1972 b)
Conn. Tissue Res. 1, 3 - 13
- KEFALIDES, N.A. (1973)
Int. Rev. Conn. Tissue Res. 6, 63 - 104
- KEFALIDES, N.A. (1974)
J. Clin. Invest. 53, 403 - 407
- KEFALIDES, N.A., Winzler, R.J. (1966)
Biochemistry 5, 702 - 712
- KEFALIDES, N.A., Denduchis, B. (1969)
Biochemistry 8, 4613 - 4621
- KEFALIDES, N.A., Forsell-Knott, L. (1970)
Biochim. Biophys. Acta 203, 62 - 66
- KEFALIDES, N.A., Tomichek, E., Alper, R. (1975 a)
in: Protides of the Biol. Fluids, 22nd Coll, 349 - 356
Ed: Peeters, H.
Pergamon Press, New York
- KEFALIDES, N.A., Tomichek, E., Alper, R. (1975 b)
in: Extracell. Matrix Influence on Gene Expression, 129 - 136
Ed: Slavkin, H.C., Greulich, R.C.
Academic Press, London, New York
- KEFALIDES, N.A., Cameron, J.D., Tomichek, E., Yanoff, M. (1976)
J. Biol. Chem. 251, 730 - 733
- KENT, P.W. (1967)
in: Essays in Biochem., Vol. 3, 105 - 151
Ed: Campbell, P.N., Greville, G.D.
Academic Press, London, New York
- KHYM, J., Zill, L.P. (1952)
J. Am. Chem. Soc. 74, 2090 - 2094
- KIBEL, G. (1975)
Dissertation
- KIBEL, G., Heilhecker, A., Bruchhausen, v.F. (1974)
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 282, R 46 (abstr.)

- KIBEL, G., Heilhecker, A. Bruchhausen, v.F. (1976)
Biochem. J., 155, 535 - 541
- KILO, Ch., Vogler, N., Williamsen, J.R. (1972)
Diabetes 21, 881 - 889
- KIMMELSTIEL, P. (1966)
in: The Kidney, 226 - 252
Ed: Mostofi, F.K. Smith, D.E.
Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland
- KLEIN, L., Butcher, D.L., Sudilovsky, O., Kikhawer, R.,
Miller, M. (1975)
Diabetes 24, 1057 - 1065
- KLINGER, G., Geyer, G. (1965)
Acta histochem. 21, 261 - 267
- KOBAYASHI, T.K., Pedrini, V. (1973)
Biochem. Biophys. Acta 303, 148 - 160
- KORNFELD, R., Kornfeld, S. (1976)
Ann. Rev. Biochem. 45, 217 - 237
- KRAKOWER, C.A., Greenspon, S.A. (1951)
Am. Arch. Pathol. 51, 629 - 639
- KRAKOWER, C.A., Greenspon, S.A. (1964)
in: Small Blood Vessel Involvement in Diabetes Mellitus, 161
Ed: Siperstein, M.D., Colwell, A.R., Meyer, K.
Amer. Inst. Biol. Sci., Washington, DC
- KRAKOWER, C.A., Greenspon, S.A., Warren, H.M. (1957)
Exp. Cell Res. 13, 320 - 342
- KRISKO, I., Gyorkey, F. (1974)
in: Energy Regulation and Biosynthesis in Mol. Biol., 345 - 358
Ed: Richter, D
de Gruyter, Berlin
- KRISKO, I., Walker, W.G. (1974)
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 146, 942 - 947
- KUPKE, I.R. (1973)
in: Prog. Biochem. Pharmacol., Vol. 8, 57 - 124
Ed: Paoletti, R.
Karger, Basel
- KURTZ, S.M. (1958)
Exp. Cell Res. 14, 355 - 367
- KURTZ, S.M. (1961)
Lab. Invest. 10, 1189 - 1208

- KURTZ, S.M., McManus, J.F.A. (1960)
J. Ultrastruc. Res. 4, 81 - 87
- KURTZ, S.M., Feldman, J.D. (1962)
J. Ultrastruc. Res. 6, 19 - 27
- LAMBERTS, B., Buss, H., Heintz, R. (1973)
Clin. Nephrology 1, 81 - 85
- LAMBERTS, B., Ochs, H.J., Heintz, R. (1974)
Res. Exp. Med. 164, 185 - 192
- LANDIS, E.M., Pappenheimer, J.R. (1963)
in: Handbook Physiology, sect. 2, Vol. 2, 961 - 1034
Ed: Hamilton, W.F., Dow, P.
Amer. Physiol. Soc., Washington, DC
- LANE, M.D., Moss, J. (1971)
in: Metabolic Pathways, 3rd ed., Vol. 5, 23 - 54
Ed: Vogel, H.J.
Academic Press, London, New York
- LANGE, Jr., C.F., Markowitz, A.S. (1965)
Biochim. Biophys. Acta 101, 217 - 220
- LANGNER, R.O., Newman, R.A. (1972)
Anal. Biochem. 48, 73 - 79
- LANNIGAN, R., Blainey, C.D., Brewer, D.B. (1964)
J. Pathol. Bacteriol. 88, 255 - 261
- LAPIERE, Ch. M., Lenaers, A., Pierard, G. (1973)
in: Biol. of Fibroblast, 379 - 384
Ed: Kulonen, E., Pikkariainen, J.
Academic Press, London, New York
- LAST, J.A., Baer, J., Millson, Ch. (1976)
Conn. Tissue Res. 4, 149 - 153
- LATTA, H. (1960)
Calif. Med. 93, 272 - 287
- LATTA, H., (1970)
J. Ultrastruc. Res. 32, 526 - 544
- LATTA, H., Maunsbach, A.B., Madden, S.C. (1960)
J. Ultrastruc. Res. 4, 455 - 472
- LATTA, H., Maunsbach, A.B., Osvaldo, L. (1967)
in: Ultrastructure of the Kidney, 1 - 56
Ed: Dalton, A.J., Haguenau, F.
Academic Press, London, New York
- LAYMAN, D.L., McGoodwin, E.B., Martin, G.R. (1971)
Proc. Natl. Acad. Sci, USA 68, 454 - 458
- LAZAROW, A., Speidel, E. (1964)
in: Small Blood Vessel Involvement in Diabetes Mellitus, 127-15
Ed: Siperstein, M.D., Colwell, A.R., Meyer, R.
Amer. Inst. Biol. Sci., Washington, DC

- LEE, Y.C., Johnson, G.S., White, B., Scocca, J. (1971)
Anal. Biochem. 43, 640 - 643
- LEFFLER, H.H., (1959)
Am. J. Clin. Pathol. 31, 310 - 313
- LEHOTAY, D.C. (1975)
Biochim. Biophys. Acta 394, 193 - 203
- LELOIR, L.F. (1964 a)
Proc. Plenary Sessions Int. Union Biochem. 33, 15-29
6th Int. Congr. Biochemistry N.Y.)
- LELOIR, L.F., (1964 b)
Biochem. J. 91, 1 - 8
- LELOIR, L.F., Cardini, C.E., Cabib, E. (1960)
in: Compar. Biochem. 2, 97 - 138
Ed: Florkin, M., Mason, H.S.
Academic Press, London, New York
- LERNER, R.A., Glasscock, R.J., Dixon, F.J. (1967)
J. Exp. Med. 126, 989 - 1004
- LEROY, E.C., Kaplan, A., Udenfriend, S., Sjoerdsma, A. (1964)
J. Biol. Chem. 239, 3350 - 3356
- LIDSKY, M.D., Sharp, J.T., Rudee, M.L. (1967)
Arch. Biochem. Biophys. 121, 491 - 501
- LILLIE, R.D. (1952)
Lab. Invest. 1, 30 - 45
- LOCY, W.A., Larcell, O. (1916)
Am. J. Anat. 19, 447 - 504
- LOWENSTEIN, J.M. (1968)
in: The Metabolic Role of Citrate, 61 - 68
Ed: Goodwin, T.W.
Academic Press, London, New York
- LOWENSTEIN, J.M. (1971)
in: Compr. Biochem. Vol. 18 S, 1 - 55
Ed: Florkin, M., Stotz, E.H.
Elsevier Publ. Comp., Amsterdam
- LUI, S., Kalant, N. (1974)
Exp. Mol. Pathol. 21, 52 - 62
- LYNEN, F. (1957)
Ann. Rev. Biochem. 26, 119 - 148
- LYNEN, F. (1959)
J. cell. comp. Physiol. 54 (Suppl. 1) 33 - 49
- LYNEN, F. (1967)
in: Organizational Biosynthesis, 243 - 266
Ed: Vogel, H.J., Lampen, J.O., Bryson, V.
Academic Press, London, New York

- LYNEN, F., Eggerer, H., Henning, U., Kessel, I. (1958)
Angewandte. Chemie 70, 738 - 742
- LYNEN, F., Agranoff, B.W., Eggerer, H., Henning, U.,
Mösllein, E.M., (1959)
Angewandte. Chemie 71, 657 - 663
- LYNEN, F., Matsushashi, M., Numa, S., Schweizer, E. (1963)
in: The Control of Lipid Metabolism, 43 - 55
Ed: Grant, J.K.
Academic Press, London, New York
- MADDY, A.H. (1964)
Biochim. Biophys. Acta 88, 448 - 449
- MAERTIN, K., (1975)
Dissertation
- MAHIEU, P. (1972)
Kidney Intern. 1, 115 - 123.
- MAHIEU, P., Winand, R.J. (1969)
Arch. Int. Physiol. Biochem., Soc. Belge Biochem. 77, 969-970
- MAHIEU, P., Winand, R.J. (1970)
Eur. J. Biochem. 15, 520 - 524
- MAHIEU, P., Winand, R.J. (1973)
Eur. J. Biochem. 37, 157 - 163
- MAIZEL Jr., J.V. (1971)
Methods Virol. 5, 179 - 246
- MAJNO, G. (1964)
in: Handbook of Physiology, sect. 2, Vol. 3, 2293 - 2375
Ed: Hamilton, W.F., Doro, P.
Amer. Physiol. Soc., Washington, DC
- MARCHESI, V.T., Andrews, E.P. (1971)
Science 174, 1247 - 1248
- MARINETTI, G.V. (1970)
in: Compr. Biochem. Vol. 18, 117 - 155
Ed: Florkin, M., Stotz, E.H.
Elsevier Publ. Comp., Amsterdam
- MARQUARDT, H., Wilson, C.B., Dixon, F.J. (1973 a)
Biochemistry 12, 3260 - 3266
- MARQUARDT, H., Wilson, C.B., Dixon, F.J. (1973 b)
Kidney Intern. 3, 57 - 65
- MARSHALL, R.D. (1972)
Ann. Rev. Biochem. 41, 673 - 702

- MARSHALL, R.D. (1974)
Biochem. Soc. Symp. 40, 17 - 26
- MARSHALL, R.D., Neuberger, A. (1970)
Adv. Carbohydr. Chem. 25, 407 - 478
- MARSHALL, R.D., Neuberger, A. (1972)
in: Glykoproteine, 2nd Ed., Part A, 224 - 299
Ed: Gottschalk, A.
Elsevier Publ. Comp., Amsterdam
- MARTIN, G.R., Byers, P.H., Piez, K.A. (1975)
Adv. Enzymol. 42, 167 - 191
- MAUER, S.M., Fish, A.J., Blau, E.B., Michael, A.F. (1972)
J. Clin. Invest. 51, 1092 - 1101
- McINTOSH, R.M., Kihara, H., Kulvinskis, C., Kaufman, D.B., Wong, S.R. (1971)
Ann. rheum Dis. 30, 631 - 637
- McKEEHAN, M.S. (1951)
J. Exp. Zool. 117, 31 - 54
- McMANUS, J.F.A. (1948)
Am. J. Pathol. 24, 643 - 653
- MEEZAN, E., Brendel, K., Ulreich, J., Carlson, E.C. (1973)
J. Pharmacol. Exp. Ther. 187, 332 - 341
- MEJBAUM, W. (1939)
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 258, 117 - 120
- MICHELSEN, P., Creemers, J. (1967)
in: Ultrastructure of the Kidney, 57 - 72
Ed: Dalton, A.J., Haguenau, F.
Academic Press, London, New York
- MICHAEL, A.F., Fish, A.J., Good, R.A. (1967)
Lab. Invest. 17, 14 - 29
- MILLER, E.J., Matukas, V.J. (1969)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 64, 1264 - 1268
- MILLER, F., Palade, J.E. (1964)
J. Cell. Biol. 23, 519 - 522
- MINOR, R.R., Clark, C.C., Koszalka, T.R., Brent, R.L., Kefalides, N.A. (1975)
in: Protides of the Biol. Fluids, 22nd Coll. 357 - 361
Ed: Peeters, H.
Pergamon Press, New York
- MINOR, R.R., Hoch, P.S., Koszalka, T.R., Brent, R.L., Kefalides, N.A. (1976 a)
Develop. Biol. 48, 344 - 364

- MINOR, R.R., Strause, E.L., Koszalka, T.R., Brent, R.L.,
Kefalides, N.A. (1976 b)
Develop. Biol. 48, 365 - 376
- MINOR, R.R., Clark, C.C., Strause, E.L., Koszalka, T.R., Brent, R.L.
Kefalides, N.A. (1976 c)
J. Biol. Chem. 251, 1789 - 1794
- MISRA, R.P. (1972)
Am. J. Clin. Pathol. 58, 135 - 139
- MISRA, R.P. (1973)
Immunology 25, 967 - 980
- MISRA, R.P., Berman, L.B. (1966)
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 122, 705 - 710
- MISRA, R.P., Berman, L.B. (1968)
Lab. Invest. 18, 131 - 138
- MISRA, R.P., Berman, L.B. (1972)
Lab. Invest. 26, 666 - 670
- MISRA, R.P., Kalant, N. (1966)
Nephron 3, 84 - 102
- MISSMAHL, H.P. (1957)
Z. Zellforsch. 45, 612 - 619
- MOHOS, S.C., Skoza, L. (1969)
Science 164, 1519 - 1521
- MOHOS, S.C., Skoza, L. (1970)
Exp. Mol. Pathol. 12, 316 - 323
- MORTON, R.K. (1950)
Nature (London) 166, 1092 - 1095
- MUELLER, C.B., Mason, Jr., A.D., Stout, E.G. (1955)
Am. J. Med. 18, 267 - 276
- MEYERS, C., Bartlett, P. (1972)
Biochim. Biophys. Acta 290, 150 - 157
- NAGANO, M., Schäfer, H.E. (1963)
Klin. Wschr. 41, 1203 - 1207
- NAGEL, H. (1934)
Z. Zellforsch. 21, 376 - 387
- NEUBERGER, A., Gottschalk, A., Marshall, R.D. (1966)
in: Glykoproteins 273 - 295
Ed: Gottschalk, A.
Elsevier Publ. Comp., Amsterdam

- NEUFELD, E.F., Hassid, W.Z. (1963)
Adv. Carbohydr. Chem. 18, 309 - 356
- NEUFELD, E.F., Ginsburg, V. (1965)
Ann. Rev. Biochem. 34, 297 - 312
- NEWMAN, R.A., Langner, R.O. (1975)
Anal. Biochem. 66, 175 - 184
- NICHOLAS, B.K., Krakower, C.A., Greenspon, S.A. (1973)
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 142, 1316 - 1321
- NIESSING, K., Rollhäuser, H. (1954)
Z. Zellforsch. 39, 431 - 446
- NIKAIDO, H., Hassid, W.Z. (1971)
Adv. Carbohydr. Chem. 26, 351 - 483
- NOVIKOFF, A.B., Novikoff, P.M., Quintane, N. Davis, C. (1972)
J. Histochem. Cytochem. 20, 745 - 749
- NOWINSKI, W.W., Pigon, A. (1967)
J. Histochem. Cytochem. 15, 31 - 37
- NUMA, S. (1974)
Ergeb. Physiol. 69, 53 - 96
- NUMA, S., Yamashita, S. (1974)
in: Current Topics in Cellular Regulation, Vol. 8, 197 - 246
Ed: Horecker, B.L., Stadtman, E.R.
Academic Press, London, New York
- ØSTERBY, R. (1972)
Diabetologia 8, 84 - 92
- ØSTERBY-Hansen, R., Lundbaek, K., Olsen, T.S., Ørskov, H. (1967)
Lab. Invest. 17, 675 - 692
- ØSTERBY-Hansen, R., Lundbaek, K. (1970)
in: Diabetes Mellitus: Theory and Practice, 178 - 209
Ed: Ellenberg, M., Rifkin, H.
McGraw Hill Book Comp., London
- OHNO, M., Riquetti, P., Hudson, B.G. (1975)
J. Biol. Chem. 250, 7780 - 7787
- OHNUKI, T. (1975)
Acta Path. Jap. 25, 319 - 331
- OLIVER, C., Essner, E. (1972)
J. Exp. Med. 136, 291 - 304
- ORMOS, J., Solbach, H. G. (1963)
Frankf.Z. Pathol. 72, 379 - 418

- OSAWA, G., Kimmelstiel, P., Seiling, V. (1966)
Am. J. Pathol. 45, 7 - 20
- OSHIMA, K., Hatano, M., Maeyama, Y., Sugino, N., Takeuchi, T. (1967)
Proc. 3rd Int. Congr. Nephology, 45 - 53
Karger, Basel
- PAPPENHEIMER, J.R. (1955)
Klin. Wschr. 33, 362 - 365
- PATRIDGE, S.M. (1973)
in: Biology of Fibroblast, 13 - 39
Ed: Kulonen, E., Pikkariainen, J.
Academic Press, London, New York
- PEASE, D.C. (1955 a)
Anat. Rec. 121, 701 - 721
- PEASE, D.C. (1955 b)
J. Histochem. Cytochem. 3, 295 - 308
- PEASE, D.C. (1960)
4. Intern. Kongr. für Elektronenmikroskopie 1958, 139
Springer, Berlin
- PEARSON, C.H. (1963)
Biochem. J. 88, 540 - 545
- PESSINA, A.C., Hulme, B., Peart, W.S. (1972)
Proc. Royal Soc. London, 180, 61 - 76
- PIERCE, G.B. (1970)
in: Chem. Mol. Biol. Intercell. Matrix, Vol. 1, 471 - 506
Ed: Balazs, E.A.
Academic Press, London, New York
- PIRIE, A. (1951)
Biochem. J. 48, 368 - 371
- PITT-Rivers, R., Imbombato, F.S.A. (1968)
Biochem. J. 109, 825 - 830
- PRIDHAM, J.B. (1965)
Adv. Carbohydr. Chem. 20, 371 - 408
- PROCKOP, D.J. (1970)
in: Chem. Mol. Biol. Intercell. Matrix, Vol. 1, 335 - 370
Ed: Balazs, E.A.
Academic Press, London, New York
- PROCKOP, D.J., Udenfriend, S. (1960)
Anal. Biochem. 1, 228 - 239

- PROCKOP, D.J., Dehm, P., Olsen, B.R., Berg, A.A., Grant, M.E.,
Uitto, J., Kivirikko, K.H. (1973)
in: *Biology of Fibroblast*, 311 - 320
Ed: Kulonen, E., Pikkariainen, J.
Academic Press, London, New York
- QUADRACCI, L.J., Striker, J.E. (1970)
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 135, 947 - 950
- RAMBOURG, A., Leblond, C.P. (1967)
J. Ultrastruc. Res. 20, 306 - 309
- REGNAULT, F., Kern, P. (1974)
Path. Biol. 22, 737 - 739
- RENKIN, E.M., Pappenheimer, J.R. (1957)
Ergeb. Physiol. 49, 59 - 126
- RENKIN, E.M., Gilmore, J.P. (1973)
in: *Handbook of Physiology*, Sec. 8, 185 - 248
Ed: Orloff, J., Berliner, R.W., Geiger, S.R.
Amer. Physiol. Soc., Washington, DC
- REYNOLDS, J.A., Tanford, C. (1970 a)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 66, 1002 - 1007
- REYNOLDS, J.A., Tanford, C. (1970 b)
J. Biol. Chem. 245, 5161 - 5165
- RHODIN, J. (1955)
J. Exp. Cell Res. 8, 572 - 574
- RHODIN, J. (1962)
J. Ultrastruc. Res. 6, 171 - 185
- RICHTERICH, R., Franz, H.E. (1960)
Nature (London) 188, 498 - 499
- RICHTERICH, R., Franz, H.E. (1961)
Biochem. Z. 334, 149 - 167
- RINEHART, J.F., Farquhar, M.G., Jung, H.C., Abul-Haj, S.K. (1953)
Am. J. Pathol. 29, 21 - 31
- RODEWALD, R., Karnovsky, M.J. (1974)
J. Cell Biol. 60, 423 - 433
- ROE, J.H. (1955)
J. Biol. Chem. 212, 335 - 343
- ROMEN, W., Schultze, B., Hempel, U. (1976)
Virchows Arch. Abt. B Cell. Pathol., 20, 125 - 137

- ROSENQUIST, T.H., Bernick, S. (1971)
J. Gerontol. 26, 176 - 185
- ROSEMAN, S. (1959)
Ann. Rev. Biochem. 28, 545 - 578
- ROSENBLOOM, J., Prockop, D.J. (1969)
in: The scientific basis for surgical practice, 117 - 135
Ed: Dunphy, J.E., von Winkle Jr., W.,
McGraw Hill Book Comp. New York
- ROSSITER, R.J. (1968)
in: Metabolic Pathways, 2nd Ed., Vol. II, 69 - 115
Ed: Greenberg, D.M.
Academic Press, London, New York
- RUBIN, A.L., Drake, M.P., Davison, P.F., Pfahl, D., Speakman, P.T.,
Schmitt, F.O. (1965)
Biochemistry 4, 181 - 190
- SALIVAR, W.O., Sinsheimer, P.L. (1969)
J. Mol. Biol. 41, 39 - 45
- SATO, T., Munakata, H., Yoshinaga, K., Yosizawa, Z. (1975)
Tohoku J. exp. Med. 115, 299 - 306
- SATO, T., Spiro, R.G. (1976)
J. Biol. Chem. 251, 4062 - 4070
- SCHACHTER, H. (1974)
Biochem. Soc. Symp. 40, 57 - 71
- SCHEUNER, G., Hutschenreiter, J. (1971)
Z. mikr. anat. Forsch. 83, 454 - 456
- SCHEINMAN, J.I., Fish, A.J., Brown, D.M., Michael, A.F. (1974)
J. Clin. Invest. 53, 71 a
- SCHMIDT, F.H., v. Dahl, K. (1968)
Z. Klin. Chem. 6, 156 - 159
- SCHMID, K. (1972)
Chimica 26, 405 - 414
- SCHOLTAN, W. (1959)
Z. Ges. exp. Med. 130, 556 - 576
- SCHNEEBERGER, E.E. (1974)
Nephron 13, 7 - 21
- SCHULTZ, J., Felberg, N., Sosamma, J. (1967)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 543 - 549

- SEGREST, J.P., Jackson, R.C., Andrews, E.P.,
Marchesi, V.T. (1971)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 390 - 395
- SEIBLES, T.S., Weil, L. (1967)
Methods. Enzymol. 11, 204 - 206
Ed: Colowick, S.P., Kaplan, N.O.
Academic Press, London, New York
- SHARP, J.T., Anderson, M.S., Lidsky, M.D. (1967)
J. Immunol. 99, 1254 - 1263
- SHAPIRO, A.L., Vinuela, E., Maizel Jr., J.V. (1967)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 815 - 820
- SHIBATA, S., Miyakawa, Y., Naruse, T., Nagasawa, T. Takuma, T. (1969)
J. Immunol. 102, 593 - 601
- SHIBATA, S., Naruse, T., Miyakawa, Y., Nagasawa, T. (1970)
J. Immunol. 104, 215 - 223
- SITTE, H. (1959)
Verh. dtsch. Ges. Path. 43, 225 - 234
- SKOGLUND, R.W. (1970)
Invest. Urol. 8, 284 - 285
- SKOZA, L., Mohos, S.C. (1968)
Fed. Proc. 27 (246 (Abstr.))
- SKOZA, L., Mohos, S.C. (1969)
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 131, 1189 - 1193
- SKOZA, L., Mohos, S.C. (1974)
Lab. Invest. 30, 93 - 101
- SOLOMON, D.H., Gardella, J.W., Fanger, H., Dethier, F.M.,
Ferrebee, J.W. (1949)
J. Exp. Med. 90, 267 - 271
- SPIRO, D. (1959)
Am. J. Path. 35, 47 - 73
- SPIRO, R.G. (1963)
New Engl. J. Med. 269, 566 - 573
- SPIRO, R.G. (1966)
Methods Enzymol. 8, 3 - 26
Ed: Colowick, S.P., Kaplan, N.O.
Academic Press, London, New York
- SPIRO, R.G. (1967)
J. Biol. Chem. 242, a): 1915-1922, b) 1923-1932, c) 4813-4823

- SPIRO, R.G. (1969)
New Engl. J. Med. 281, 991 - 1001
- SPIRO, R.G. (1970 a)
Ann. Rev. Biochem. 39, 599 - 638
- SPIRO, R.G. (1970 b)
in: Chem. Mol. Biol. Intercell. Matrix, Vol. 1, 511 - 534
Ed: Balazs, E.A.
Academic Press, London, New York
- SPIRO, R.G. (1970 c)
in: Diabetes Mellitus: Theory and Practice, 210 - 229
Ed: Ellenberg, M., Rifkin, H.
McGraw Hill Book Comp., London
- SPIRO, R.G. (1971)
in: Joslin's Diabetes Mellitus, 146 - 156
Ed: Marble, A., White, P., Bradley, R.F., Krall, L.P.
Lea and Febiger, Philadelphia
- SPIRO, R.G. (1972)
in: Glykoproteins, 2nd ed, Part B, 964 - 999
Ed: Gottschalk, A.
Elsevier Pub. Comp., Amsterdam
- SPIRO, R.G. (1973 a)
Adv. Prot. Chem. 27, 349 - 467
- SPIRO, R.G. (1973 b)
New Engl. J. Med. 285, 1337 - 1342
- SPIRO, R.G. (1976 a)
Diabetes 25, (Suppl. 2) 909 - 913
- SPIRO, R.G. (1976 b)
Diabetologia 12, 1 - 14
- SPIRO, R.G. Spiro, M.J. (1965)
J. Biol. Chem. 240, 997 - 1001
- SPIRO, R.G., Spiro, M.J. (1966)
J. Biol. Chem. 241, 1271 - 1282
- SPIRO, R.G., Spiro, M.J. (1971 a)
J. Biol. Chem. 246, 4899 - 4909, 4910 - 4918
- SPIRO, R.G. Spiro, M.J. (1971 b)
Diabetes 20, 641 - 648
- SPIRO, R.G., Spiro, M.J., Adamany, A.M. (1974)
Biochem. Soc. Symp. 40, 37 - 56

- STAHL, E., Kaltenbach, K. (1961)
J. Chromatogr. 5, 351 - 355
- STAUBESAND, J. (1963)
Klin. Wschr. 41, 975 - 976
- STEBLAY, R.W. (1962)
J. Exp. Med. 116, 253 - 272
- STEBLAY, R.W. (1963)
Nature, (London) 197, 1173 - 1176
- STEBLAY, R.W. (1965)
J. Immunol. 95, 517 - 524
- STEGEMANN, H. (1958)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 311, 41 - 45
- STEINBERG, D. (1963)
in: Control of Lipid Metabolism, 111 - 138
Ed: Grant, J.K.
Academic Press, London, New York
- STEINHARDT, J., Reynolds, J.A. (1969)
Multiple Equilibria in Proteins
Academic Press, London, New York
- STERNBERG, M., Kalant, N. (1973)
CR Acad. Sc. Paris, 276 D, 1365 - 1368
- STROMINGER, J.L. (1960)
Physiol. Rev. 40, 55 - 111
- STUMPF, P.K. (1969)
Ann. Rev. Biochem. 38, 159 - 212
- SUND, K., Weber, K., Mölbert, E. (1967)
Eur. J. Biochem. 1, 400 - 410
- SUZUKI, Y., Churg, J., Grishman, E., Mauter, W., Dachs, S. (1963)
Am. J. Pathol. 43, 555 - 578
- SVENNERHOLM, L. (1957)
Biochim. Biophys. Acta 24, 604 - 611
- TANFORD, C. (1968)
Adv. Prot. Chem. 23, 121-282
- TANZER, M.L., Fairweather, R., Gallop, P.M. (1972)
Arch. Biochem. Biophys. 151, 137 - 141
- TANZER, M.L., Kefalides, N.A. (1973)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 51, 775 - 780

- TANZER, R.L., Church, R.L., Yaeger, J.A., Park, E.D. (1975)
in: Extracell. Matrix Influences on Gene Expression, 785 - 793
Ed: Slavkin, H.C., Greulich, R.C.
Academic Press, London, New York
- TAYLOR, D.G., Price, R.G., Robinson, D. (1971)
Biochem., J. 122, 641 - 645
- THIEL, A. (1958)
Z. Zellforsch. 47, 288 - 319
- THOENES, W., (1961)
Klin. Wschr. 39, 504 - 518
- THOENES, W. (1965)
Verhandl. dtsch. Ges. Pathol. 49, 14 - 45
- THOENES, W. (1967)
Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 78, 561 - 582
- THOENES, W. (1969)
Hippokrates 40, 609 - 617
- THOENES, G.H., Hammer, D.K. (1967)
Clin. Chim. Acta 18, 253 - 265
- THOMPSON Jr., G.A. (1970)
in: Compr. Biochem. Vol. 18, 157 - 199
Ed: Florkin, M., Stotz, E.H.
Elsevier Publ. Comp., Amsterdam
- THOMPSON Jr., G.A. (1973)
in: Form and Function of Phospholipids, 67 - 96
Ed: Ansell, G.B., Hawthorne, J.N., Dawson, R.M.C.
Elsevier Publ. Comp., Amsterdam
- TÖRNBLOM, N. (1957)
Acta med. Scand. 159, 369 - 373
- TRAUB, W., Piez, K.A. (1971)
Adv. Prot. Chem. 25, 243 - 352
- TRIPLETT, R.B., Summers, J., Ellis, D.E., Cossaway, V.L. (1972)
Biochim. Biophys. Acta 266, 484 - 493
- TUSZYNSKI, G.P., Warren, L. (1975)
Anal. Biochem. 67, 55 - 65
- UMBREIT, W.W., Burris, R.H., Stauffer, J.F. (1951)
in: Manometric Techn. and Tissue Metabolism, 2nd Ed. 119
Burgess Publ. Comp. Minneapolis
- UNANUE, E.R., Dixon, F.J. (1967 a)
Adv. Immunol. 6, 1 - 90

- UNANUE, E.R., Dixon, F.J. (1967 b)
J. Exp. Med. 125, 149 - 162
- VAGELOS, R.R. (1964)
in: Current Topics in Cellular Regulation, Vol. 4, 119 - 166
Ed: Horecker, B.L., Stadtman, E.R.
Academic Press, London, New York
- VANCURA, P., Miller, W.L., Little, J.W., Malt, R.A. (1970)
Am. J. Physiol. 219, 78 - 83
- VENKATACHALAM, M.A., Karnovsky, M.J., Fahmi, H.D., Cotran, R.S. (1970)
J. Exp. Med. 132, 1153 - 1167
- VERNIER, R.L. (1964)
in: Small Blood Vessel Involvement in Diabetes Mellitus, 57-63
Ed: Siperstein, M.D., Colwell, A.R., Meyer, K.
Amer. Inst. Biol. Sci., Washington, DC
- VERNIER, R.L., Birch-Andersen, A. (1962)
J. Pediat. 60, 754 - 768
- VERNIER, R.L., Birch-Andersen, A. (1963)
J. Ultrastruc. Res. 8, 66 - 88
- VOLLRATH, L. (1968)
Dtsch. med. Wschr. 93, 360 - 365
- VRACKO, R. (1974)
Diabetes 23, 94 - 104
- WAEHNELDT, T.V. (1975)
Bio Systems 6, 176 - 187
- WAHL, P., Deppermann, D. (1970)
Klin. Wschr. 48, 653 - 658
- WAHL, P., Krezdorn, W., Deppermann, D. (1970)
Klin. Wschr. 48, 650 - 653
- WAKIL, G.J. (1962)
Ann. Rev. Biochem. 31, 369 - 406
- WAKIL, G.J., Barnes Jr., E.M. (1971)
in: Compr. Biochem. Vol. 18 S, 57 - 104
Ed: Florkin, M., Stotz, E.H.
Elsevier Publ. Comp., Amsterdam
- WALKER, F. (1970)
Experientia 26, 291 - 292
- WALKER, F. (1972 a, b)
J. Pathol. 107, a) 119 - 121, b) 123 - 125

- WALKER, F. (1972 c)
Virchows Arch. Abt. B Cell. Pathol. 11, 90 - 96
- WALKER, F. (1973)
J. Pathol. 110, 233 - 244
- WALKER, W.G. (1967)
in: Acute Glomerulonephritis 261 - 270
Ed: Metcalf, J.
Churchill, London
- WALLACH, D.F.H., Zahler, P.H. (1966)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56, 1552 - 1559
- WALLENIUS, G. (1954)
Acta Soc. Med. Upsal. 59, 1 - 91
- WARREN, L. (1959)
J. Biol. Chem. 234, 1971 - 1975
- WATSON, D. (1960)
Clin. Chim. Acta 5, 637 - 643
- WATSON, J.A., Lowenstein, J.M. (1970)
J. Biol. Chem. 245, 5993 - 6002
- WEBER, K., Osborn, M. (1969)
J. Biol. Chem. 244, 4406 - 4412
- WELLING, L.W., Grantham, J.J. (1972)
J. Clin. Invest. 51, 1063 - 1075
- WESTBERG, N.G. (1976)
Diabetes 25 (Suppl. 2), 920 - 924
- WESTBERG, N.G., Michael, A.F. (1970)
Biochemistry 9, 3837 - 3845
- WESTBERG, N.G., Michael, A.F. (1973)
Acta Med. Scand. 194, 39 - 47, 49 - 57
- WESTPHAL, O., Lüderitz, O., Bister, F. (1952)
Z. Naturforsch. 7b, 148 - 155
- WHALEY, W.G. (1975)
The Golgi Apparatus
Springer, Wien, New York
- WIELE, H., Horak, E. (1970)
J. Chromatogr. 47, 527 - 529
- WILLIAMS, I.F., Harwood, R., Grant, M.E. (1976)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 70, 200 - 206

- WILSON, C.B., Dixon, F.J. (1974)
Ann. Rev. Med. 25, 83 - 98
- WINZLER, R.J. (1955)
Methods Biochem. Anal. 2, 279 - 311
- WINZLER, R.J., Bekesi, J.G. (1967)
in: Methods in Cancer Research Vol. 2, 159 - 202
Ed: Busch, H.
Academic Press, London, New York
- WISLOCKI, G.B., Padykula, H.A. (1953)
Am. J. Anat. 92, 117 - 151
- WOESSNER, J.F. (1961)
Arch. Biochem. Biophys. 93, 440 - 447
- WOLFF, J. (1962)
Berl. Med. 13, 19 - 23
- WOLFF, J. (1963)
Z. Zellforsch. 60, 409 - 431
- YAMADA, E. (1955)
J. biophys. biochem. Cytol. 1, 551 - 566
- ZACHARIUS, R.M., Zell, T.E., Morrison, J.H., Woudlock, J.L. (1969)
Anal. Biochem. 30, 148 - 152
- ZAK, B., Dickenman, R.C., White, E.G., Burnett, H., Cherney, P.G. (1954)
Am. J. clin. Pathol. 24, 1307 - 1315
- ZILVERSMIT, D.B., Davis, A.K. (1950)
J. Lab. Clin. Med. 35, 155 - 160
- ZLATKIS, A., Zak, B., Boyle, A.J. (1953)
J. Lab. Clin. Med. 41, 486 - 492
- ZÖLLNER, N., Kirsch, K. (1962)
Z. ges. exp. Med. 135, 545 - 561

Herrn Prof. Dr. med. Franz von Bruchhausen danke ich für die Überlassung des Themas und die hilfreichen Anregungen und Ratschläge.

Ich danke auch Herrn Helmut Dietz für Konstruktion und Bau der Apparate zur Gelelektrophorese und Präparation der Glomeruli.

LEBENS LAUF

Name: Alfred Heilhecker
geboren am: 6. Januar 1940
in: Wiesbaden

Ausbildung

Schulen:

1946 - 1951 Grundschule in Wiesbaden
1951 - 1960 Oranienschule, Gymnasium für Jungen
in Wiesbaden
1960 Abitur

Universitäten:

1960 - 1964 Chemiestudium an der Julius-Maximilians-
Universität in Würzburg
1964 Vordiplom
1965 - 1968 Chemiestudium an der Freien Universität Berlin
1968 Diplomprüfung
1968 / 1969 Diplomarbeit: "Synthese und elektronenspek-
troskopische Charakterisierung einiger tetra-
arylsubstituierter Diazocyclopentadiene"

Tätigkeiten:

1965 6 Monate Forschungstätigkeit bei Siemens in
München, 3 Monate Aufenthalt in London zur
Vertiefung der Sprachkenntnisse
seit 1966 Tätigkeiten während der Semesterferien in den
Forschungslaboratorien der Firmen: BASF,
Nordmark und Farbwerke Hoechst
seit 1970 Wissenschaftlicher Assistent am
Pharmakologischen Institut der Freien Univer-
sität Berlin

